

**Auswirkungen der Langzeitthrombozytenspende auf
Stammzellpopulationen im peripheren Blut**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Marco Julius Schnabel

geboren am 05.03.1985 in Bernburg

Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. med. Dagmar Barz, Jena
2. Herr Prof. Dr. med. Andreas Hochhaus, Jena
3. Herr Prof. Dr. med. Michael Spannagl, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07. Mai 2013

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APC	Allophycocyanin
BFU	burst forming unit
BFU-E	Untergruppe erythrozytären Stammzellen
CAMT	kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie
CD	cluster of differentiation
CD45(-)	Proben ohne CD45 Markierung
CEPC	zirkulierende endotheliale Progenitorzelle
CFU	colony forming unit
CFU-B	unipotente Stammzelle basophiler Granulozyten
CFU-E	unipotente erythrozytäre Stammzelle
CFU-Eo	unipotente Stammzelle eosinophiler Granulozyten
CFU-GM	bipotente Stammzelle der granulozytären, monozytären Reihe
CFU-GEMM	multipotente gemischte myeloische Stammzelle
CFU-Meg	unipotente megakaryozytäre Stammzelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	endotheliale Progenitorzelle
Epo	Erythropoietin
ES	Erstspender (Vollblut)
FACS	Durchflusszytometer

FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL-	Fluoreszenzphotodetektor
FSC	forward scatter channel, vorderer Streulichtphotodetektor
G-CSF	granulozytäre Kolonie stimulierender Wachstumsfaktor
Hb	Hämoglobin
HLA	human leucocyte antigen system
Hk	Hämatokrit
LS	Langzeitthrombozytenspender
MCV	Erythrozytenvolumen
MCH	Hämoglobin pro Erythrozyt
MCHC	Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten
M-CSF	monozytäre Kolonie stimulierender Wachstumsfaktor
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PLT	Thrombozyten
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PRP	plättchenreiches Plasma
RBC	Erythrozyten
S_ges	Kumulationsvariable Gesamtspendenanzahl
SCF	Stem cell factor
SSC	side scatter channel, seitlicher Streulichtphotodetektor
TK	Thrombozytenkonzentrat

TK_ges	Kumulationsvariable Anzahl gespendeter Thrombozytenkonzentrate
TK_ml	Kumulationsvariable Gesamtvolumen gespendeter Thrombozytenkonzentrate
Tpo	Thrombopoietin
Tpo R	Thrombopoietin Rezeptor
VEGF	vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor
WBC	Leukozyten

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	IV
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	2
2.1. Blut: Funktion und Bestandteile.....	2
2.1.1. Blutplasma.....	2
2.1.2. Erythrozyten	3
2.1.3. Leukozyten	4
2.1.4. Monozyten.....	7
2.1.5. Lymphozyten.....	7
2.1.6. Thrombozyten	8
2.1.7. Hämatopoetische Stammzellen	10
2.1.7.1. Das CD34 Antigen	13
2.1.7.2. Das CD133 Antigen	13
2.1.7.3. Das CD45 Antigen	14
2.1.7.4. Das CD110 Antigen	15
2.1.7.5. Das VEGFR-2 Antigen	16
2.1.8. Megakaryozytäre Stammzellen	16
2.1.9. Endotheliale Stammzellen.....	18
2.2. Bedarf an Blutprodukten.....	20
2.3. Blutspende.....	20
2.3.1. Physiologische Grundlagen der Blutspende.....	21
2.3.2. Vollblutspende.....	21
2.3.3. Hämapherese	22
2.3.4. Thrombozytenspende	22

2.3.5. Anforderungen an den Spender	24
2.3.6. Komplikationen & Langzeitfolgen der Blutspende.....	25
2.4. Durchflusszytometrie	26
2.5. Fluoreszenzanalyse bei der Durchflusszytometrie.....	30
3. Fragestellung und Ziele der Arbeit	32
4. Material und Methoden.....	34
4.1. Lösungen & Antikörper	34
4.1.1. PBS.....	34
4.1.2. FACS Lysing Solution	34
4.1.3. FcR Blocking Reagent human.....	34
4.1.4. RPE Fluoreszenzkit	35
4.1.5. FACSFlow Sheath Fluid	35
4.1.6. CD110-PE	35
4.1.7. CD133-PE	35
4.1.8. CD45-FITC	36
4.1.9. CD34-APC	36
4.1.10. VEGFR2-PerCP	36
4.2. Probanden.....	36
4.3. Vorbereitung und Probenverarbeitung.....	38
4.3.1. PE-Markierung des CD110	38
4.3.2. Probenverarbeitung	38
4.4. FACS Analyse und Auswertung	40
4.5. Statistische Auswertung.....	46
5. Ergebnisse.....	47
5.1. Einfluss der CD45 Markierung.....	47
5.2. Einfluss von R1	50
5.3. Studienpopulation	52

5.4. Kofaktoren.....	56
5.5. Datenauswertung.....	57
5.6. Auswirkung der CD45 Integration.....	60
5.7. Langzeitspender: Auswirkung der Gesamtspendenanzahl.....	61
5.8. Subgruppenanalyse Langzeitthrombozytenspender.....	62
6. Diskussion	67
6.1. Thrombozytäre Stammzellen	67
6.1.1. Methodik	68
6.1.2. Ergebnisse	71
6.1.3. Limitation und Schlussfolgerung	75
6.2. Endotheliale Stammzellen.....	77
6.2.1. Methodik	77
6.2.2. Ergebnisse	78
6.2.3. Schlussfolgerung	79
6.3. Weitere Blutbildveränderungen	80
7. Schlussfolgerungen	82
8. Literatur- und Quellenverzeichnis	83
9. Anhang.....	93
9.1. Lebenslauf.....	93
9.2. Danksagung.....	95
9.3. Ehrenwörtliche Erklärung	96

1. Zusammenfassung

Die Basis dieser Promotionsarbeit ist eine prospektive Studie zur Beurteilung einer möglichen Veränderung des Stammzellpools unter dem Einfluss einer anhaltenden, repetitiven Thrombozytenspende. Hintergrund ist die seit Jahren bestehende Kontroverse über mögliche Langzeitfolgen einer dauerhaft, wiederkehrenden Thrombozytenapherese für die Spender.

In dem Zeitraum September bis Dezember 2009 konnten in diese Arbeit 183 Probanden am Blutspendezentrum der Universität Jena eingeschlossen werden. Mittels der Durchflusszytometrie wurde die Konzentration thrombozytärer und endothelialer Stammzellen im peripheren Blut der Blutspender untersucht. Als Studienpopulation dienten Langzeitthrombozytenspenden, welche mit Vollbluterst Spendern verglichen wurden. Ähnliche methodische Ansätze sind in der Literatur bisher nicht zu finden. Trotz einiger Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung, konnten signifikante Unterschiede zwischen beiden Spendergruppen dargestellt werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint eine wiederholte Thrombozytenspende zu einer erhöhten Konzentration endothelialer Stammzellen im peripheren Blut zu führen. Die Messungen der thrombozytären Stammzellen zeigten einen ähnlichen Trend. Jedoch waren diese Analysedaten statistisch weniger robust.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die langandauernde, wiederholte Thrombozytenspende zu einer Konzentrationserhöhung der peripher messbaren Stammzellen führt. Ob dies langfristig eine Auswirkung auf die Gesundheit der Spender hat, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beurteilbar.

2. Einleitung

2.1. Blut: Funktion und Bestandteile

„Das Blut ist ein flüssiges Organ“ (Schmidt et al. 2010). Es transportiert Zellen und gelöste Stoffe. Seine Aufgaben liegen im Transport von Nährstoffen und Metaboliten, Vitaminen und Hormonen, Atemgasen, sowie Wärme.

Es besteht aus dem Blutplasma und den darin gelösten Zellen. Der korpuskuläre Anteil wird durch die roten Blutkörperchen mit 99% dominiert. Weiterhin befinden sich weiße Blutkörperchen und Blutplättchen im peripheren Blut.

Die Relation zwischen dem Blutvolumen und den Erythrozyten wird als Hämatokrit (Hk) bezeichnet. Dieser ermöglicht Rückschlüsse auf den Flüssigkeitshaushalt und die Viskosität des Blutes. Der Normwert liegt beim erwachsenen, gesunden Mann im Mittel bei 0,47, bei der Frau bei 0,42. Für Kinder und Neugeborene gelten andere Richtwerte (Schmidt et al. 2010).

2.1.1. Blutplasma

Das Blutplasma setzt sich aus Wasser, Proteinen, Elektrolyten und transportierten Stoffen zusammen. Die Elektrolytkonzentration im Blutplasma wird in engen Wertebereichen gehalten, Isoionie genannt. Hierbei spielt das Kaliumion eine maßgebliche Rolle für die Stabilität des Ruhemembranpotentials elektrisch erregbarer Gewebe. Natrium- und Chloridionen hingegen sind hauptverantwortlich für den osmotischen Druck im Gefäßsystem, welcher den Wasseraustausch zwischen Interstitium und Zellen bestimmt. Eine hypertone Konzentration der beiden Ionen führt dabei zu einem Wasserausstrom aus der Zelle und dadurch zu deren Schrumpfung. Die Hypotonie hingegen führt zu einem zellulären Wassereinstrom und damit zur Zellschwellung. Proteine bestimmen mit einem Anteil von lediglich 4% am osmotischen Druck, dem kolloidosmotischen Druck, den Austausch von Wasser zwischen dem Intravasalraum und dem Interstitium. Eine Verringerung der Proteinkonzentration führt zum interstitiellen Ödem. Weitere Aufgaben der im Plasma gelösten Proteine sind die Transportfunktion niedermolekularer Substanzen durch Proteinbindung, spezifisch (Eisen-3-Ion durch Ferritin) oder unspezifisch (Kalziumion durch Albumin), sowie Lösungsvermittler lipophiler Stoffe. Außerdem obliegt den Proteinen,

aufgrund ihrer Amphiphilität, eine gewisse Pufferfunktion, wodurch sie dazu beitragen den pH-Wert im Blut zu regulieren. Weiterhin dienen zirkulierende Proteine als ein Aminosäurereservoir, welches bei Bedarf dem Stoffwechsel und der Proteinsynthese zugeführt werden kann. Auf die Blutgerinnung spezialisierte Eiweiße sind für die Regulation der Hämostase mitverantwortlich. Während andere die Immunabwehr spezifisch (Antikörper), beziehungsweise unspezifisch (Komplementfaktoren und akute Phase Proteine) unterstützen (Schmidt et al. 2010).

2.1.2. Erythrozyten

Die roten Blutkörperchen sind 7,5µm große bikonkave Scheiben, mit einer maximalen Dicke von 2µm. Sie sind kernlos und enthalten hauptsächlich Hämoglobin, welches dem Atemgastransport dient. Die spezielle Form der roten Blutkörperchen ermöglicht ihnen, durch eine verringerte Diffusionsstrecke, bei großer Diffusionsfläche, einen erleichterten Atemgasaustausch und aufgrund der guten Verformbarkeit eine Passage durch das enge Kapillargefäßsystem. Das Volumen der Erythrozyten wird als MCV angegeben und beträgt im Mittel 85fl. MCH gibt die Hämoglobinmasse pro Erythrozyt an und liegt normochrom bei 30pg. Die mittlere Hämoglobinkonzentration der roten Blutkörperchen (MCHC) beträgt 300 bis 360 g/l (Schmidt et al. 2010).

Erythrozyten haben eine Lebensdauer von 100-120 Tagen. Danach werden sie von phagozytierenden Zellen in Leber, Milz und Knochenmark abgebaut. Gealterte Erythrozyten werden fortlaufend durch neue ersetzt. Die Bildung der roten Blutkörperchen (Erythrozytopoese) findet im Knochenmark statt. Dort entstehen sie aus erythrozytären Stammzellen. Junge, kernlose Erythrozyten enthalten in den ersten ein bis zwei Tagen noch RNA-Reste und Zellorganellen, welche im geringen Maße Hämoglobin synthetisieren können. Sie werden als Retikulozyten bezeichnet (Junqueira et al. 2004). Im adulten Blutbild machen sie circa 0,5-1,5% der Gesamterthrozyten aus (Hagemann 2010).

Reguliert wird die Erythrozytopoese durch das Hormon Erythropoietin. Bei einem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe sind die Isoenzyme Hypoxie-induzierbarer-Faktor 1 und 2 (HIF-1, HIF-2) vermehrt im Blut nachweisbar. Diese sind unter Sauerstoffmangel stabiler und stellen einen Transkriptionsfaktor für die Genexpression von Erythropoietin, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und weitere antihypoxische Proteine dar.

Erythropoietin oder auch Epo genannt, wird hauptsächlich von peritubulär gelegenen, fibroblastenartigen Zellen gebildet. Weitere Synthesorte sind das Gehirn und die Leber. Epo selber bindet an spezialisierte Membranrezeptoren der erythrozytären Vorläuferzellen im Knochenmark, durch deren Aktivierung wird die Apoptose dieser Zellen verhindert. Dies ermöglicht eine weitere Proliferation und Differenzierung der Stammzellen. Weitere hormonelle Einflussfaktoren auf die Bildung der roten Blutkörperchen sind die Erythropoietinsynthese steigernden Schilddrüsenhormone, sowie die wirkungsverstärkenden Somatomedine (insulin like growth factor) und Geschlechtshormone. Androgene sind hierbei für den Hämatokritunterschied zwischen männlichen und weiblichen Individuen verantwortlich (Schmidt et al. 2010).

„Verminderung von Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl und oder Hämatokrit unter die altersentsprechenden und geschlechtsspezifischen Referenzwerte“ wird als Anämie bezeichnet (Pschyrembel und Dornblüth 2007). Gründe hierfür können in einer gestörten Synthese oder einem erhöhten Verbrauch liegen. Die häufigste Ursache von Bildungsstörungen ist der Eisenmangel. Da das Eisenion das enzymatisch aktive Zentrum des Hämoglobins bildet, kommt es bei einem Mangel zu einer verminderten Erythropoese. Weitere Ursachen können ein Mangel an Erythropoietin, Vitamin B12, Folsäure oder eine Knochenmarkschädigung sein. Ein erhöhter Verbrauch der Erythrozyten ist häufig bedingt durch eine Blutung, die akut oder chronisch verlaufen kann. Weitere Formen sind durch eine gesteigerte Hämolyse begründet. Auslöser können Antikörper gegen Erythrozytenbestandteile, Hypersplenismus oder strukturelle Defekte der roten Blutkörperchen sein (Schmidt et al. 2010).

2.1.3. Leukozyten

Als Leukozyten werden die weißen Blutkörperchen bezeichnet. Sie besitzen im Gegensatz zu den Erythrozyten einen Kern und kein Hämoglobin. Der Normwert für diese Zellen ist einer größeren Schwankungsbreite unterworfen, er liegt zwischen 4000 – 10000 Zellen/ μ l (Hagemann 2010). Eine Verminderung der Leukozyten unter diese Grenze bezeichnet man als Leukopenie, einen Abfall unter 1000 Zellen/ μ l als Agranulozytose. Die Erhöhung der Zellzahl über 10000/ μ l wird als Leukozytose bezeichnet. Diese kann im Rahmen von Entzündungsreaktionen oder als Extremvariante bei Leukämien auftreten. Die Leukozyten

werden in drei verschiedene Gruppen unterteilt, die sich alle aus denselben pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Die Lymphozyten differenzieren sich aus den lymphatischen Stammzellen. Die Granulozyten und Monozyten entstammen den myeloischen Stammzellen (Schmidt et al. 2010). Die Abbildung 1 demonstriert die Differenzierungsstadien der Leukozyten.

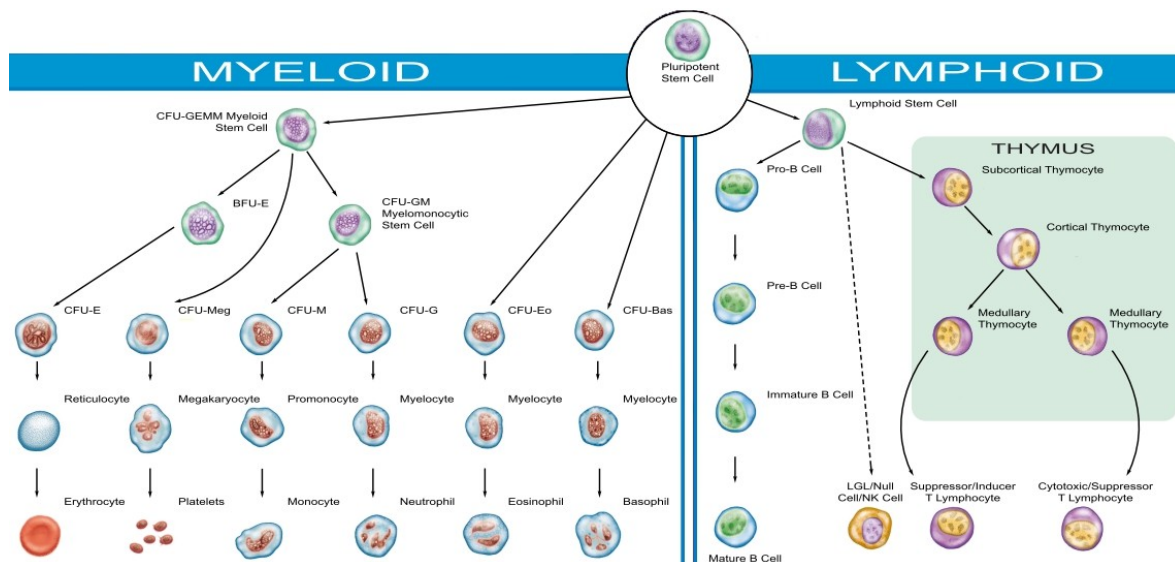


Abbildung 1: Hämatopoetische Reihe der Leukozyten. Differenzierung der einzelnen Subklassen aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Bild modifiziert nach (AbD Serotec 2010).

Die Hauptaufgabe der weißen Blutkörperchen liegt in Abwehr von Infektionen. Durch körpereigene und bakterielle Zytokine angelockt, wie zum Beispiel Interleukin-8, migrieren Leukozyten mit amöboider Bewegung aus dem Intravasalraum, entgegen des Konzentrationsgefälles, zum Infektionsort. Dort angekommen können die Leukozyten, je nach Differenzierung mit unterschiedlichen Mechanismen ausgestattet, die Erreger bekämpfen (Schmidt et al. 2010).

Die Granulozyten, als größte Untergruppe der Leukozyten, spielen eine entscheidende Rolle in der unspezifischen zellulären Abwehr. Sie sind 10 – 17µm im Durchmesser. Je nach Anfärbbarkeit ihrer intrazellulären Granula werden sie in die Hauptgruppe der neutrophilen Granulozyten, eosinophile oder basophile Granulozyten subklassifiziert (Schmidt et al. 2010).

Reife neutrophile Granulozyten besitzen einen polymorphen Zellkern und werden als segmentkernige Neutrophile bezeichnet. Sie zirkulieren lediglich sechs bis acht Stunden im Blut. Jedoch verharren circa 50% segmentkernigen Neutrophilen an der Gefäßwand in Milz oder Lunge. Unter der Wirkung von Cortisol und Adrenalin können diese Leukozyten schnell mobilisiert werden. Bei einer sehr starken Stresseinwirkung kann es zur Mobilisation von jungen, stabkernigen Neutrophilen und unreifen Metamyelozyten kommen. Ein vermehrtes Auftreten dieser Zellen bezeichnet man als Linksverschiebung. Die neutrophilen Granulozyten sind ein Hauptakteur der unspezifischen zellulären Abwehr. Sie sind zur Phagozytose befähigt und in ihrer Granula befinden sich Enzyme zur Zerstörung der bakteriellen Zellwand. Weiterhin bilden sie reaktive Sauerstoffradikale, Prostaglandine und Leukotriene. Diese sind zum einen für die lokale Gewebereaktion mit erhöhter Gefäßpermeabilität, Erwärmung, Schwellung und Schmerzen verantwortlich. Zum anderen unterhalten diese Zytokine durch das Anlocken weiterer Leukozyten die lokale Entzündung bis die Ursache beseitigt ist (Schmidt et al. 2010). Die Normwerte beim Erwachsenen, anteilig gemessen an den Gesamtleukozyten, liegen für die segmentkernigen Neutrophilen zwischen 50 bis 70% und für die Stabkernigen zwischen 3 bis 5% (Hagemann 2010).

Eosinophile Granulozyten machen 1 bis 4% der Leukozyten im normalen, adulten Blutbild aus (Hagemann 2010). Eine Steigerung über diese Normwerte hinaus kann einerseits der normalen zirkadianen Schwankung unterliegen, welche abhängig vom Cortisolspiegel ist. Eine Senkung des Cortisols führt hierbei zu einer Erhöhung der Eosinophilenzahl, dies kann um 24 Uhr bis zu 20% ausmachen. Andererseits fungieren die Eosinophilen als Abwehr von Parasiten und eine Eosinophilie kann somit ein Zeichen für einen Wurmbefall sein. Weiterhin wird eine Vermehrung dieser Zellen bei allergischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen beobachtet. Die normale Lebenszeit der Eosinophilen beträgt ungefähr 10 Tage, davon verweilen sie 4 bis 10 Stunden im Intravasalraum (Schmidt et al. 2010).

Die kleinste Subpopulation der Granulozyten, mit 0 bis 1% sind die Basophilen (Hagemann 2010). Sie sind gekennzeichnet durch ihre basophile Granula welche Heparin und Histamin enthält. Durch Aufnahme fettreicher Nahrung kommt zu einer Erhöhung der Basophilenzahl im Blut. Es folgt die Aktivierung der Zellen und Freisetzung von Heparin, welches den Fettsäurestoffwechsel anregt. Das außerdem abgesonderte Histamin kann zu einer

allergischen Reaktion mit Steigerung der Gefäßpermeabilität, Hautrötung, Quaddelbildung und eventuell Bronchospasmus führen (Schmidt et al. 2010).

2.1.4. Monozyten

Die Monozyten sind mit 12 bis 20µm Durchmesser die größten Leukozyten. Im Blutbild haben sie einen Anteil von 3 bis 7 % (Hagemann 2010). Bevor die Monozyten in das Gewebe auswandern und sich zu gewebspezifischen Makrophagen differenzieren befinden sie sich 2 bis 3 Tage im Blut. Die höchste Konzentration an Gewebsmakrophagen findet man in den Alveolen, Milz, Leber, Knochenmark und dem lymphatischen Gewebe. Dort können die Zellen für mehrere Monate verweilen. Im Vergleich zu den anderen Leukozytenarten haben die Makrophagen die größte Phagozytosekapazität. In Kombination mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen und lysosomaler Enzyme besitzen sie ein hohes mikrobizides Potential. Darüber hinaus sind Makrophagen zur Stimulation anderen Immunzellen befähigt. Dies geschieht einerseits durch die Ausschüttung von Zytokinen, andererseits können sie fremde Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren und damit Lymphozyten stimulieren und aktivieren (Schmidt et al. 2010).

2.1.5. Lymphozyten

Lymphozyten sind Zellen der spezifischen Immunantwort und werden in B-, T-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) unterteilt. Im adulten Blutbild machen Lymphozyten 25-45% der Leukozyten aus (Hagemann 2010). Ihre Größe liegt zwischen 6 und 10µm. Mikroskopisch besitzen die kleinen B-Lymphozyten und T-Helferzellen einen schmalen zytoplasmatischen Randsaum und einen großen runden Kern. NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen hingegen sind größer, haben ein breiteres Zytoplasma und besitzen azurophile Granula (Kiefel 2010).

Die B-Lymphozyten sind für die spezifische humorale Immunantwort zuständig. Sie tragen Immunglobuline an ihrer Oberfläche und besitzen weitere Rezeptoren die für ihre Funktion und Differenzierung wichtig sind. Als junge Zellen werden sie im lymphatischen Gewebe des Knochenmarks geprägt. Nach Kontakt mit einem spezifischen Antigen und gleichzeitiger

Aktivierung durch T-Helferzellen beginnen sie zu proliferieren und als Plasmazellen mit der Bildung antigenspezifischer Antikörper. Ein Teil der Zellen wandert nach der Prägung in das Gewebe aus. Hier können sie über Jahre verharren und weiter antigenspezifische Antikörper bilden (Kiefel 2010).

T-Lymphozyten sind durch den an der Oberfläche exprimierten T-Zellrezeptor gekennzeichnet. Ihre Prägung erhalten sie im Thymus. Sie sind für die spezifische zelluläre Immunantwort zuständig und werden in CD8 positive zytotoxische Zellen, CD4 positive T-Helferzellen und T-Reg Zellen subklassifiziert. Die CD8 positiven T-Zellen binden an HLA-Klasse-I Moleküle. Bei Aktivierung vernichten sie die Antigen tragende Zelle und stimulieren zusätzlich die unspezifische Immunabwehr durch Zytokinsekretion. Die T-Helferzellen ihrerseits interagieren mit HLA-II Molekülen und wirken als Modulator der antigenspezifischen Immunantwort. T-Reg Zellen sind eine Untergruppe der CD4 positiven T-Zellen. Ihre Funktion liegt in der Regulation der T-Zellaktivität und dem Erhalt der Selbsttoleranz (Kiefel 2010).

Natürliche Killer Zellen sind zytotoxische Zellen. Sie lysieren nicht HLA-I tragende und somit körperfremde Zellen. Weiterhin haben sie eine geringe regulatorische Funktion und spielen bei der Antikörper vermittelten, spezifischen Immunantwort eine Rolle (Kiefel 2010).

2.1.6. Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose Zellen und hauptverantwortlich für die zellulär vermittelte primäre Hämostase durch Thrombenbildung. Im peripheren Blut Erwachsener finden sich 1500000 bis 350000 Zellen pro Mikroliter Blut (Schmidt et al. 2010).

Histologisch sind die Blutplättchen in ihrer Ruheform linsenförmige Scheibchen mit einem Durchmesser von 2-4 μ m und einer Dicke von circa 0,5 μ m. Sie enthalten neben Mitochondrien, für den oxidativen Stoffwechsel und zur Bildung von Sauerstoffradikalen, Lysosomen, α -Granula und δ -Granula. In der α -Granula befinden sich die prokoagulatorischen Substanzen Fibrinogen, Gerinnungsfaktoren, Fibronectin, Plättchenfaktor-4, aber auch PDGF, welches unter anderem als Wachstumsfaktor für Fibroblasten fungiert. Plättchen aktivierendes ADP, ATP, Calcium und Serotonin sind Inhaltsstoffe der δ -Granula. Weiterhin besitzen die Blutplättchen ein dense tubular system,

welches einen Kalziumspeicher darstellt der bei Aktivierung nach intrazellulär entleert werden kann (Junqueira et al. 2004).

Bei einer Gefäßendothelläsion kommt es zur Plättchenaktivierung. Durch die Integritätsstörung der Gefäßwand werden Kollagen, Fibronectin und Laminin des darunterliegenden subendothelialen Bindegewebes freigelegt. Über ihren Oberflächenrezeptor GPIIb/IX binden die noch inaktiven Thrombozyten durch den von-Willebrand-Faktor vermittelt an Kollagen. Die bei dem Endothelschaden zerstörten Zellen setzen Plättchen aktivierende Substanzen wie ADP frei. Diese Stimulation der Blutplättchen führt zu deren Aktivierung. Kalzium vermittelt ändern die Plättchen binnen weniger Sekunden ihre Form in kugelige Zellen mit langen stacheligen Ausläufern. Über den GPIIb/IIIa Rezeptor binden sie an im Blut zirkulierendes Fibrinogen. Die Konformationsänderung und Bindung von Fibrinogen führt zu einer Vernetzung mit weiteren Thrombozyten. Nach Aktivierung beginnen die Thrombozyten ihre Granula auszuschütten. Darin enthaltenes ADP stimuliert die Thrombozyten parakrin und autokrin. Somit werden weitere Thrombozyten rekrutiert und die thrombozytäre Aktivierung verstärkt. Weiterhin kommt es zur Freisetzung von Gerinnungsfaktoren, welche die plasmatische Gerinnung initiieren. In der Folge der Aktivierung beginnt die thrombozytäre Zyklooxygenase mit der Bildung von Thromboxan A₂ und Prostaglandinen aus Arachidonsäure. Auch diese Substanzen verstärken die Gerinnungsreaktion und führen gemeinsam mit freigesetztem Serotonin und Katecholaminen zur regionären Vasokonstriktion. Bei anhaltender Stimulation der Thrombozyten wird die bis dato umkehrbare Thrombozytenaggregation irreversibel. Ursache hierfür ist das aus der α -Granula freigesetzte Thrombospondin, welches die bereits bestehenden interthrombozytären Fibrinogenbrücken verfestigt (Schmidt et al. 2010).

Thrombozyten zirkulieren 5 bis 10 Tage im menschlichen Blut bis sie in der Leber und Milz abgebaut werden. Sie stammen aus der megakaryozytären Zelllinie, welche durch den Oberflächenmarker CD110 charakterisiert ist. Dieses Molekül stellt den Rezeptor für den Wachstumsfaktor Thrombopoietin dar (Kiefel 2010). Thrombopoietin (Tpo) wird in der Leber und in geringerem Maße von Milz, Niere und Stromazellen im Knochenmark gebildet. Die Produktion ist dabei konstant hoch und nur im Knochenmark durch eine Thrombozytopenie stimulierbar. Wie in Abbildung 2 veranschaulicht wird die Tpo Konzentration durch die Megakaryozyten und Thrombozyten per Endozytose reguliert (de Graaf und Metcalf 2011).

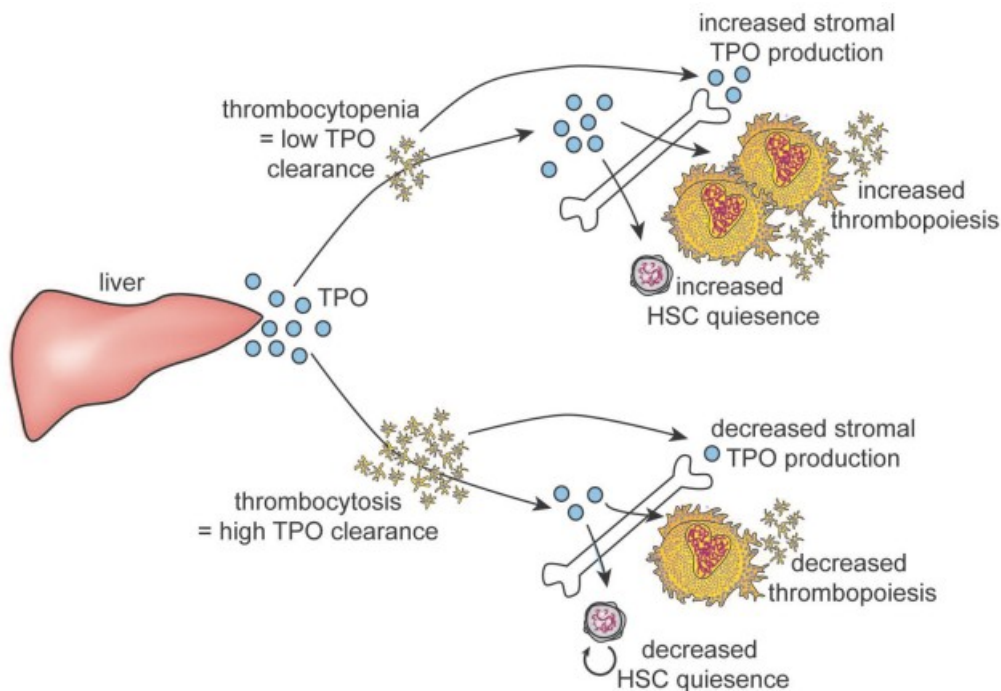


Abbildung 2: Thrombopoietinproduktion, -regulation und -Wirkung. Tpo wird hauptsächlich in der Leber gebildet. Die Konzentration wird über die Thrombozyten reguliert. Eine niedrige Zellzahl führt zu einer hohen Tpo Konzentration, verstärkten Wirkung an den hämatopoetischen Stammzellen und umgedreht (de Graaf und Metcalf 2011).

Unter dem Einfluss von Thrombopoietin kommt es zur Differenzierung der multipotenten, myeloischen Stammzelle über CFU-Meg (colony forming unit megacaryocytes) zu Megakaryoblasten und durch Kern- und Zellvergrößerung zum Megakaryozyten. Letzterer setzt, wiederum Thrombopoietin vermittelt, durch Abschnürung vom Zytoplasma bis zu 4000 einzelne Thrombozyten frei. Der gesamte Reifungsprozess dauert 5 bis 10 Tage. Nach der Ausschwemmung aus dem Knochenmark verweilen Thrombozyten weitere 36 Stunden in der Milz bis sie in die Blutbahn entlassen werden (Kiefel 2010).

2.1.7. Hämatopoetische Stammzellen

Jede Blutzelle im menschlichen Körper stammt von einer hämatopoetischen Stammzelle ab. Diese werden je nach Differenzierungsfähigkeit in pluri- (auch multipotente), bi- und unipotente Stammzellen eingeteilt. Man geht davon aus, dass alle Zelllinien von pluripotenten

Hämozytoblasten ausgehen. Diese differenzieren sich weiter in multipotente Stammzellen der myeloischen und lymphatischen Reihe. Stammzellen der myeloischen Reihe proliferieren und reifen im Knochenmark aus, die lymphatischen hingegen im lymphatischen Gewebe (Junqueira et al. 2004).

Die multipotente, myeloische Stammzelle entwickelt sich weiter zur bi- und später unipotenten Progenitorzelle. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Zellen, bei denen stets eine Tochterzelle der Erhaltung des Stammzellenpools dient, differenzieren sich Progenitorzellen vollständig zu spezialisierten Blutzellen aus. Bei der weiteren Reifung bilden die myeloischen Progenitorzellen Kolonien, die in vitro bei Kultivierungsversuchen ersichtlich werden. Sie werden deshalb auch als colony forming unit (CFU) oder burst forming unit (BFU) bezeichnet. Je nach Differenzierung werden sie als CFU-E oder BFU-E für erythrozytäre, CFU-GM für granulozytäre und monozytäre, CFU-Meg für megakaryozytäre, CFU-Eo für eosinophile, CFU-B für basophile, CFU-GEMM für gemischte Progenitorzellen bezeichnet. (Kiefel 2010). In der Abbildung 3 können die Differenzierungsstadien nachvollzogen werden.

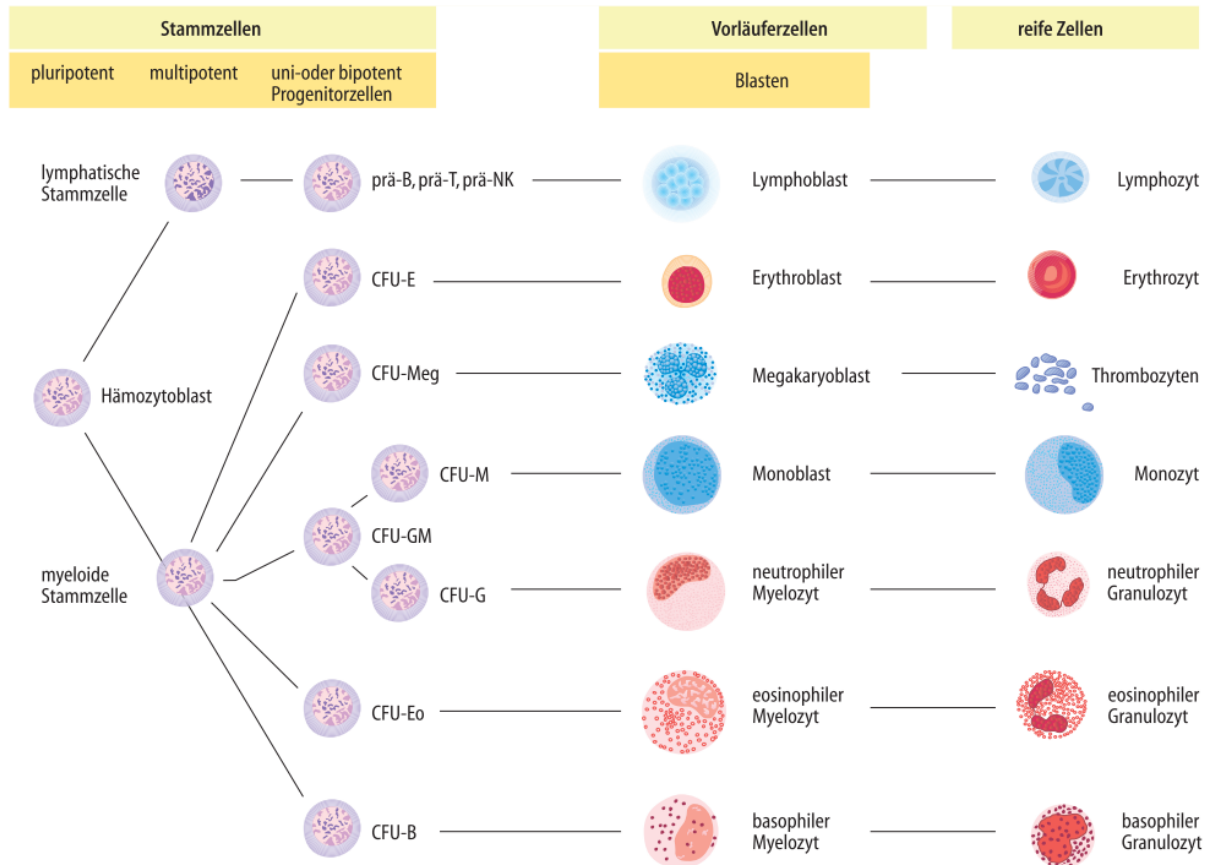


Abbildung 3: Überblick zu Zellentwicklungsstadien bei der Leukopoese (Junqueira et al. 2004).

Mikroskopisch sind die einzelnen Vorläuferstufen der Blutzellen erst ab dem, Blastenstadium, welches sich den Progenitorzellen anschließt, unterscheidbar. Bis dahin ist lediglich eine immunhistochemische Differenzierung anhand der ausgebildeten Oberflächenantigene möglich (Junqueira et al. 2004).

Diese Antigene werden nach der internationalen CD-Nomenklatur (CD entspricht cluster of differentiation) eingeteilt (Zola et al. 2005). Nach aktuellem Stand werden mehr als 360 verschiedene Antigene in der CD-Nomenklatur geführt. Einige dieser Oberflächenmarker kommen ubiquitär vor. Das CD45 ist hierbei ein Marker der auf allen Leukozyten, unabhängig von deren Entwicklungsstadium, vorkommt. CD34 hingegen ist ein unspezifischer Stammzellmarker. Andere wie das CD133, CD110 oder CD309 sind charakteristisch für wenige Zellen oder Zelllinien (AbD Serotec 2010).

Einschränkend sei erwähnt, dass mittlerweile auch Stammzellen nachgewiesen werden konnten die keinen der etablierten Stammzellmarker aufwiesen. Ciraci et al. fanden pluripotente Stammzellen die CD34, CD45 und CD133 negativ waren. In ihrem Model konnten diese Zellen sich dennoch in hämatopoetische und endotheliale Zellen weiterentwickeln (Ciraci et al. 2011).

Die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen wird durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren gesteuert. Je nach Wirkung kann man sie in 3 Gruppen einteilen. Einerseits gibt es Wachstumsfaktoren die in der Spätphase der Hämatopoese wirken und zur Enddifferenzierung der Zelle führen. Zu diesen zählen Erythropoietin für die roten Blutkörperchen, G-CSF für die Granulozyten, M-CSF für die Monozyten und Thrombopoietin für die megakaryozytäre Linie. Andererseits gibt es nicht linienspezifische Wachstumsfaktoren. Wirkung auf multipotente Stammzellen haben dabei GM-CSF und Interleukin-4. Des Weiteren werden ruhende pluripotente Hämoytoblasten durch Interleukin 3 und 11, sowie Thrombopoietin, Stammzellfaktor (SCF) und G-CSF stimuliert. Zu beachten ist, dass mit steigender Potenz der Zelle eine größere Anzahl an gleichzeitig wirkender Mediatoren von Nöten ist um diese zu aktivieren (Kiefel 2010).

Einige dieser Wachstumsfaktoren agieren über spezifische Oberflächenantigene, wie zum Beispiel VEGF über CD309 (Karkkainen und Petrova 2000). Das Vorkommen und die Funktion der oben genannten CD Antigene werden in den folgenden Abschnitten im Detail betrachtet.

2.1.7.1. Das CD34 Antigen

CD34 ist ein Oberflächenantigen aller hämatopoetischen Stammzellenlinien. Es wird von der pluripotenten Stammzelle bis hin zur myeloischen beziehungsweise lymphatischen Progenitorzelle ausgebildet (Civin et al. 1990). Während pluripotente Stammzellen eine sehr starke Expression aufweisen, sie werden auch als CD34^{bright} bezeichnet, so sinkt diese mit zunehmender Zelldifferenzierung, sogenannte CD34^{dim} Zellen. Auf adulten, enddifferenzierten Zellen ist CD34 nicht mehr nachweisbar (Krause et al. 1996). Neben den Stammzellen konnte die Ausbildung von CD34 auf vaskulärem Endothel (Fina et al. 1990), Fibroblasten (Brown et al. 1991) und im hohen Maße auf Makrophagen gezeigt werden (Nielsen und McNagny 2009). Obwohl ubiquitär vorhanden, ist die Funktion von CD34 noch nicht vollständig verstanden. Basierend auf Tiermodellen, wurde CD34 schon seit längerer Zeit ein Einfluss auf die Adhäsion und das „homing“ von Stammzellen nachgesagt (Bonnet 2003). In ihrem Review von 2009 fassen Nielsen und McNagny die aktuellen Erkenntnisse zusammen. So scheint CD34 nur in hochendothelialen Venulen des lymphatischen Gewebes eine Adhäsionsfunktion auszuüben. Es steigert dabei die Permeabilität und erleichtert eine transendotheliale Migration der Leukozyten. Auf Makrophagen exprimiert, wirkt CD34 hingegen antiadhäsiv. Die Autoren schlussfolgern, dass CD34 diese Funktion auch auf Endothelzellen ausübt und darüber eine unspezifische Bindung von Leukozyten, Stammzellen und benachbarten Endothelzellen blockiert. Weiterhin scheint diese antiadhäsive Eigenschaft eine Tumormetastasierung zu begünstigen (Nielsen und McNagny 2009).

2.1.7.2. Das CD133 Antigen

CD133 ist ein Epitop des humanen Prominin-1 Moleküls (Fargeas et al. 2003). Nach neuen Erkenntnissen ist es dem AC133 Antigen, welches die glykosilierte Form des CD133 darstellt, nicht gleichzusetzen. AC133 scheint dabei der spezifischere Stammzellmarker zu sein. Im Gegensatz zu CD133, welches im geringen Maße auch auf differenzierten Zellen gefunden wird, ist AC133 ausschließlich auf Stammzellen nachweisbar (Florek et al. 2005).

Bei AC133 handelt sich um ein Oberflächenantigen der hämatopoetischen Stammzellen, dass nach Enddifferenzierung nicht mehr nachweisbar ist (Yin et al. 1997, Peichev et al. 2000, Corbeil et al. 2000). In Kombination mit VEFG-R2 findet sich AC133 auf endothelialen

Progenitorzellen (Peichev et al. 2000). Die nicht glykosilierte Form, CD133, tritt in neuronalen Stammzellen (Uchida et al. 2000) und prostatichen Epithelstammzellen (Richardson et al. 2004), AC133 in embryonalem Epithel (Corbeil et al. 2000) und Muskelstammzellen (Torrente et al. 2004) auf. Trotz der weiten Verbreitung ist die Funktionsweise von Prominin-1 und seiner Epitope noch unklar. Es wird vermutet, dass es einen Einfluss auf die Zellerneuerung, Migration und Differenzierung hat (Shmelkov et al. 2005). In den letzten Jahren rückte AC133, beziehungsweise CD133, durch den Nachweis in einigen Karzinomen in den Fokus. Die aus diesen Tumoren selektierten Zellen zeigten die Fähigkeit, Tumorgewebe nach Chemotherapie oder Radiatio erneut zu bilden und werden deshalb als Tumorstammzellen bezeichnet. Der Nachweis von AC133 gelang im Retinoblastom und Teratokarzinom. CD133 fand man im Prostatakarzinom, Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom und hepatozellulärem Karzinom (Mizrak et al. 2008).

2.1.7.3. Das CD45 Antigen

CD45 ist eine Rezeptor Tyrosinkinase. Als solche ist es hauptverantwortlich für die Integration von Umgebungssignalen in die zelluläre Antwort. Man findet CD45 auf allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen, sowie auf Lymphozyten bei welchen es 10% der Oberfläche einnimmt. Die Rezeptordichte steigt bei T- und B-Lymphozyten, sowie der myeloischen Linie mit dem Entwicklungsstadium. Bei Erythrozyten und Plasmazellen hingegen sinkt sie. Je nach Zelltypen, Entwicklungsstadium und Aktivität existieren verschiedene Isoformen dieses Oberflächenmoleküls welche sich in ihrer extrazellulären Domäne unterscheiden.

Trotz des ubiquitären Vorkommens von CD45 ist seine Funktion noch nicht vollständig geklärt. Im Model mit Knockout-Mäusen zeigte sich, dass CD45 eine essentielle Rolle in der Lymphozytenreifung und Differenzierung spielt. Insbesondere für T-Zellen stellt es einen wichtigen Überlebensfaktor dar. Über die Regulation der Aktivierungsschwelle durch externe Reize, moduliert CD45 die zelluläre Immunantwort der T- und B-Lymphozyten sowie Neutrophilen. Es wird vermutet, dass CD45 hierdurch für das Auftreten von Autoimmunerkrankungen, Immunschwäche und Krebserkrankungen mitverantwortlich ist. Zusätzlich beeinflusst es die Makrophagenadhäsion und Mastzelldegranulation bei IgE-Stimulation. Im Model mit CD45 defizienten Mäusen zeigte sich außerdem eine

überschießende Myelopoese, was zur Vermutung einer negativen Regulatorfunktion durch CD45 führte (Hermiston et al. 2003).

2.1.7.4. Das CD110 Antigen

Das Wachstumshormon Thrombopoietin (Tpo) vermittelt seine Wirkung über das CD110 Antigen, weshalb CD110 auch als Thrombopoietinrezeptor (Tpo-R) bezeichnet wird. Vigon et al. wiesen CD110, damals als c-mpl bezeichnet, erstmalig auf menschlichen Zellen der megakaryozytären Linie, sowie den Thrombozyten nach (Vigon et al. 1992). Eine Unterscheidung der einzelnen CD110 positiven Zellentwicklungsstufen ist durch die Präsenz weiterer Oberflächenantigene möglich.

Die essentielle Rolle von CD110 für die Thrombopoese konnte anhand von Tiermodellen nachgewiesen werden. So zeigte sich bei Tpo-R Knockout-Mäusen mit einem vollständigen Verlust des CD110 in allen Zellstadien eine Reduktion der Plättchenanzahl auf 10% bis 20% im Vergleich zum Wildtyp (Gurney et al. 1994). Andererseits führt der selektive Verlust des CD110 auf enddifferenzierten Megakaryozyten und Thrombozyten zu einer exzessiven Thrombozytose (Tiedt et al. 2009).

Die Funktion von Thrombopoietin scheint aber weit über die Stimulation der Blutplättchenbildung hinaus zu gehen. In ihrem Review schreiben Chou und Mulloy dem Wachstumsfaktor zusätzlich eine essentielle Rolle für den Erhalt des frühen, undifferenzierten Stammzellpools zu (Chou und Mulloy 2011). De Graaf begründet dies mit der Ausbildung des Oberflächenantigens Tie-2 auf hämatopoetischen Stammzellen, welches unter der Wirkung von Tpo die Adhärenz dieser Zellen im Knochenmark verstärkt. Außerdem stimuliert Tpo die Vermehrung der Hämatopoetischen Stammzellen im Bedarfsfall (de Graaf und Metcalf 2011).

Aufgrund der tiefgreifenden Verwurzelung des CD110 als Wachstumsfaktor im hämatopoetischen System ist es nicht überraschend, dass auch einige Formen der akuten myeloischen und lymphatischen Leukämie eine starke Expression dieses Rezeptors aufweisen (Chou und Mulloy 2011).

2.1.7.5. Das VEGFR-2 Antigen

Die Klasse der VEGF sind die wichtigsten Wachstumsfaktoren für die Angiogenese und binden an die Gruppe der VEGF-Rezeptoren. VEGF steht hierbei für vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor. Es werden die drei Rezeptor-Isoformen VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (CD309, KDR bzw. Flk-1) und VEGFR-3 (Flt-4) unterschieden (Karkkainen und Petrova 2000).

VEGFR2 ist der Hauptrezeptor auf den Endothelzellen. Über ihn wird die Mitoseaktivität der endothelialen Stammzellen erhöht (Asahara et al. 1999), sowie die Proliferation und Migration der Endothelzellen gesteuert (Meyer et al. 1999). Sein Signal dient dem endothelialen Zellüberleben und schützt unter anderem vor TNF-alpha induzierter Apoptose (Gerber et al. 1998).

VEGFR-1 kann als Co-Rezeptor für VEGFR-2 angesehen werden. Ihm wird eine Regulatorfunktion zugeschrieben. Durch seine 10-fach höhere Affinität zu VEGF im Vergleich zu VEGFR-2, begrenzt VEGFR-1 die Verfügbarkeit von Substrat für den VEGFR-2 (de Vries et al. 1992). Hierdurch wird eine überschießende, unkoordinierte Angiogenese in der Embryonalphase verhindert (Fong et al. 1995). Außerdem wird über die Aktivierung von VEGFR-1 chemotaktisch die Monozytenmigration stimuliert (Shibuya 2006).

VEGFR-3 wird besonders in fenestriertem Endothel und Tumorblutgefäßen nachgewiesen. Er ist hauptverantwortlich für die Ausbildung lymphatischer Gefäße (Alitalo und Carmeliet 2002). In der frühen Embryogenese scheint er außerdem eine essentielle Rolle für die kardiovaskuläre Entwicklung zu spielen (Dumont et al. 1998).

2.1.8. Megakaryozytäre Stammzellen

Megakaryozyten sind für die Bildung von Thrombozyten verantwortlich und entstammen der myeloischen Stammzelllinie (Abbildung 4). Als Charakteristikum der megakaryozytären Linie dient der Rezeptor für das Wachstumshormon Thrombopoietin, das CD110 Antigen (Vigon et al. 1992). Inklusive des pluripotenten Hämocytoblastens besitzen alle Zellen dieser Entwicklungslinie diesen Rezeptor. Anhand weiterer Oberflächenmarker lassen sich die einzelnen Zellstadien unterscheiden. Multipotente CFU-GEMM weisen neben CD110 unter

anderem die Stammzellmarker CD133 und CD34 auf. Die Vorstufe der Megakaryozyten, die unipotente CFU-Meg verliert bereits das CD133 Antigen. Auf den enddifferenzierten Megakaryozyten sowie Thrombozyten ist CD110 immer noch nachweisbar, es fehlen jedoch die beiden zuvor genannten Stammzellmarker (AbD Serotec 2010).

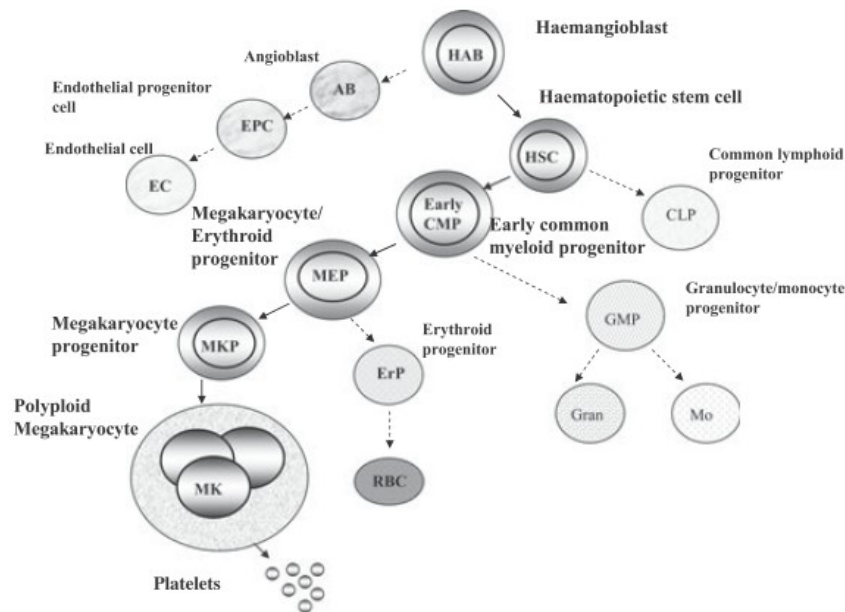


Abbildung 4: Darstellung der megakaryozytären Stammzelllinie (Deutsch und Tomer 2006). Aus dem pluripotenten Hämatopoietischen Stammzelle (HSC) entwickelt sich der pluripotente Hämatopoietische Stammzelle (HSC), welcher sich weiter zur multipotenten CFU-GEMM (early CMP) entwickelt. Aus dieser Zelle heraus entsteht die bipotente megakaryozytäre/erythrozytäre Progenitorzelle (MEP) und später die unipotente CFU-Meg (MPK). Dessen Nachfolger, der enddifferenzierte Megakaryozyt, bildet die Blutplättchen.

Als essentielle Wachstumsfaktoren dienen Thrombopoietin und der stem cell factor (SCF). SCF wird von allen Geweben produziert und seine Konzentration im Blut ist unabhängig von der Thrombozytenkonzentration. Tpo hingegen wird permanent in der Leber gebildet. Seine Konzentration wird durch die Endozytoseaktivität der Thrombozyten und Megakaryozyten reguliert. Weitere Produktionsorte scheinen die Niere und das Knochenmark zu sein. Neben Tpo und SCF existieren wahrscheinlich weitere Wachstumsfaktoren deren Anteil an der Thrombozytenbildung circa 10-20% betragen dürfte (Kaushansky 2009).

Im Grundumsatz produzieren die Megakaryozyten täglich 10^{11} Thrombozyten, innerhalb von 8 bis 9 Tagen ist gesamte Plättchenanzahl einmal erneuert. Im Bedarfsfall kann die Plättchenneubildung um das Zehnfache gesteigert werden (Deutsch und Tomer 2006).

2.1.9. Endotheliale Stammzellen

Es wird vermutet, dass im Knochenmark gebildete, zirkulierende endotheliale Stammzellen an der postnatalen Gefäß- und Endothelneubildung im menschlichen Körper beteiligt sind (Asahara et al. 1997). Diese finden bei traumatischer Verletzung des Gefäßsystems, Gewebeischämie oder im Rahmen der Tumorangiogenese statt. So konnten Gill et al. eine erhöhte Konzentration von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (CEPC) im peripheren Blut bei Verbrennungspatienten oder nach koronarer Bypassoperation nachweisen. Sie werteten dies als Zeichen der vaskulären Reparaturvorgänge (Gill et al. 2001).

In den letzten Jahren rückten die endothelialen Stammzellen vermehrt bei kardiovaskulären Erkrankungen in den wissenschaftlichen Fokus. Es konnte nachgewiesen werden, dass starker Zigarettenkonsum, bekannterweise ein Risikofaktor für vaskuläre Erkrankungen, mit einer Reduktion der CEPC einhergeht (Kondo et al. 2004). Werner und Kollegen untersuchten in ihrer prospektiven Studie die Konzentration zirkulierender epithelialer Progenitorzellen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. In einem Beobachtungszeitraum von 12 Monaten konnten sie dabei feststellen, dass eine initial erniedrigte Anzahl CEPC mit einem erhöhten Auftreten letaler kardiovaskulärer Ereignisse einherging (Werner et al. 2005).

Auch in der Tumorthherapie stoßen die endothelialen Progenitorzellen (EPC) auf großes Interesse. Die Angiogenese ist im Tumor deutlich verstärkt und gilt als essentiell in der Tumorbilogie. Über selektive Rezeptorblocker wie den VEGF-Antikörper Bevacizumab wird die Tumorangiogenese bereits als Angriffspunkt in der „target therapy“ verwandt. Um den Erfolg solcher Therapiestrategien früher sichtbar zu machen, untersucht man derzeit die EPC Konzentration im peripheren Blut als Biomarker für das Therapieansprechen. Weiterhin wird versucht, EPCs als Vehikel für Therapeutika zu nutzen, die Toxine oder Suizidgene selektiv in den Tumor einbringen (Dome et al. 2009).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind die endothelialen Stammzellen bezüglich ihrer Oberflächenmarker uneinheitlich definiert und unter ständiger Diskussion. Es wurden eine Vielzahl von Zellen mit unterschiedlichen Antigenkombinationen beschrieben die zur Endothelneubildung und Neovaskularisierung in der Lage sein sollen (Timmermans et al. 2009).

In den Reviews von Hristov und Khan werden die endothelialen Progenitorzellen (EPC) als CD34⁺ CD133⁺ VEGF-R2⁺ Zellen definiert (Khan et al. 2005, Hristov et al. 2003). Unterstützt

wird dies durch die Arbeiten von Peichev, Gehling und Quirici, die eine Bildung von Endothelzellen aus $CD133^{+}$ Zellen beschrieben (Peichev et al. 2000, Gehling et al. 2000, Quirici et al. 2001).

Timmermans et al. andererseits bezeichnen diese Zellen als hämatopoetische Progenitorzellen, die sich unter Verlust des $CD133$ Antigens in Endothel-ähnliche Zelle (EC-like cells) weiterentwickeln können (Abbildung 5). Diese EC-like cells können selber keine neuen Gefäße bilden, jedoch stimulieren sie indirekt deren Bildung durch die parakrine Ausschüttung angiogener Substanzen (Timmermans et al. 2009).

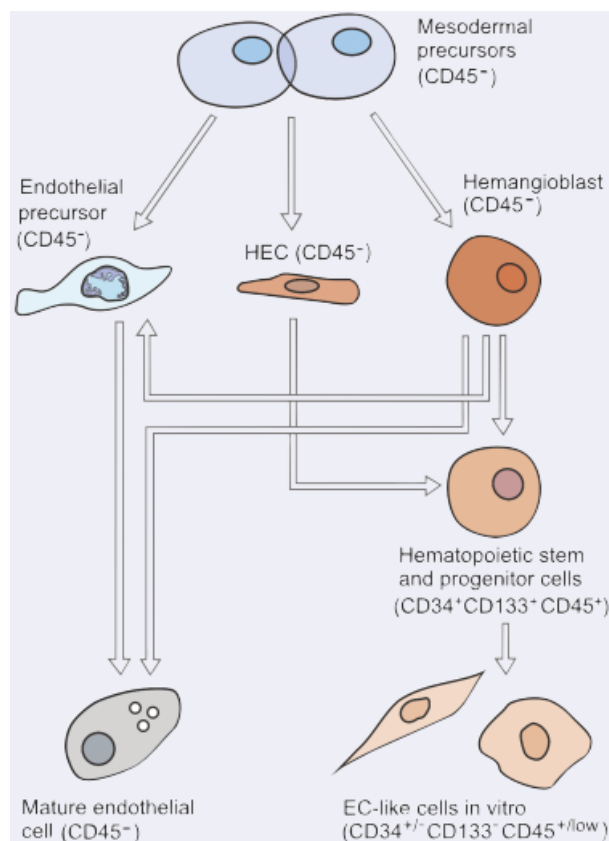


Abbildung 5: Entwicklungsweg endothelialer Zellen. Aus den mesodermalen Vorläuferzellen entwickeln sich endotheliale Vorläufer, hämatogen-endotheliale Vorläufer (HEC) und Hämagioblasten. Die beiden Letzteren können sich zu hämatopoetischen Stammzellen und später EC-like cells differenzieren (Timmermans et al. 2009).

Da bisher noch kein endgültiger Konsens über die genaue Definition der endothelialen Stammzellen erzielt werden konnte, sind die lancierten Studienergebnisse teilweise nur schwer vergleichbar. Gesucht wird derzeit ein einzigartiger Oberflächenmarker oder eine

Antigenkombination, um EPCs einheitlich klassifizieren zu können (Timmermans et al. 2009).

2.2. Bedarf an Blutprodukten

Blutprodukte finden ein breites Anwendungsspektrum in der modernen Medizin. Daher ist es nur verständlich, dass ein großer Bedarf an diesem Therapeutikum besteht. Der Jahresleistungsbericht des Universitätsklinikums Jena verdeutlicht dies. Im Jahr 2009 wurden knapp 26000 Erythrozytenkonzentrate, 7000 Thrombozytenkonzentrate, sowie 14500 Transfusionseinheiten Blutplasma in der Universitätsklinik verbraucht (Qualitätsmanagement Universitätsklinikum Jena 2010). Um eine kontinuierliche Versorgung zu gewährleisten ist es folglich wichtig, ein fortlaufend hohes Spendeaufkommen zu erzielen. Dauerspender, die einen großen Anteil am Gesamtvolumen haben, stehen besonders im Fokus.

2.3. Blutspende

Spendewillige Personen können in einer dafür geeigneten Spende Einrichtung Blut oder Blutbestandteile spenden. Dies geschieht freiwillig und unentgeltlich, wobei eine Aufwandsentschädigung möglich ist. Vor der Blutspende muss ein jeder Spender ärztlich auf Tauglichkeit untersucht und über die Risiken aufgeklärt werden. Weiterhin muss der Spender sein Einverständnis zur Spendeprozedur und der Verwendung des Blutproduktes geben (Bundesregierung Deutschland 2009).

Unabhängig vom gewählten Spendeverfahren sind die grundlegenden Maßnahmen gleich. Der Spender muss, nachdem er auf der Liege Platz genommen hat, eindeutig mit Namen und Geburtsdatum identifiziert werden. Blutproben und Spendebeutel werden entsprechend gekennzeichnet. Es folgt die Blutstauung durch eine Blutdruckmanschette oder einen einfachen Stauschlauch am Oberarm. Mittels Palpation wird in der Fossa cubiti eine zur Spende taugliche Vene aufgesucht. Im Anschluss wird das entsprechende Hautareal mit einem geeigneten Hautdesinfektionsmittel gereinigt. Mit einer Kanüle folgt die Punktion der Vene. Nach Abnahme der Blutproben beginnt die eigentliche Blutspende. Nach Abschluss der

Spende wird die Kanüle aus der Vene gezogen, die Einstichstelle 3 bis 5 Minuten mit einem sterilen Tupfer komprimiert und danach mit einem Verband versorgt (Kiefel 2010).

2.3.1. Physiologische Grundlagen der Blutspende

Eine Vollblutspende führt innerhalb von 5 bis 15 Minuten zu einem Blutverlust von circa 500ml Vollblut. Es kommt zu einem kurzzeitigen Abfall des venösen Druckes. Blutdruck und Herzfrequenz bleiben aufgrund der physiologischen Gegenregulation unverändert. Der Körper kompensiert den Blutverlust akut durch Vasokonstriktion und Rekrutierung von Blut aus den venösen Kapazitätsgefäßen. In der Regel verlaufen diese Veränderungen beim Spender klinisch stumm ab.

Innerhalb von 24 Stunden nach der Vollblutspende erfolgt der Volumenausgleich durch Zustrom von interstitieller Flüssigkeit in das Gefäßsystem. Die Leukozyten steigen für wenige Stunden um bis zu 25% an. Der Thrombozytenabfall von 10000-15000 pro Mikroliter wird durch die vermehrte Freisetzung junger Zellen aus der Milz binnen weniger Stunden kompensiert. Der Verlust an Erythrozyten beträgt $250000-350000 \times 10^9/l$ und führt zu einer geringgradigen Gewebshypoxämie. Diese wiederum steigert, Epo vermittelt, die Erythropoese (Kiefel 2010).

2.3.2. Vollblutspende

Bei der Vollblutspende wird das Blut, durch die Gravitation und Blutdruck bedingt, aus der punktierten Cubitalvene über ein Schlauchsystem in einen Sammelbeutel geleitet. Um eine Gerinnselbildung im Sammelbeutel zu verhindern wird dieser mehrfach oder besser noch kontinuierlich durchmischt. Hierfür finden meist Geräte mit einer permanenten Schaukelbewegung und integrierter Waage Anwendung. Das Erreichen der maximalen Spendemenge (450ml) oder –dauer (15 Minuten) zeigen diese Geräte durch einen visuellen oder akustischen Warnton an. Nach der Spende wird das Vollblut durch Zentrifugation in Erythrozytenkonzentrat, Plasma und „buffy coat“ aufgetrennt. Letzteres ist ein Konzentrat, dass größtenteils aus Thrombozyten und Leukozyten besteht und zu Thrombozytenkonzentrat weiterverarbeitet werden kann (Kiefel 2010).

2.3.3. Hämapherese

Im Gegensatz zur Vollblutspende wird bei der Hämapherese nur ein Teil der Blutbestandteile gewonnen. Dies hat den Vorteil, dass auch Komponenten, welche verhältnismäßig wenig im Blut vorhanden sind, wie zum Beispiel Thrombozyten, Granulozyten oder auch Stammzellen, in hoher Konzentration und Reinheit gespendet werden können. Durch die Rückführung der nicht benötigten Blutbestandteile, insbesondere der Erythrozyten, ist die Belastung des Spenders gering. Die Selektion der gewünschten Zellen wird durch Zellseparatoren in einem extrakorporalen Kreislauf ermöglicht. Diese fraktionieren das Blut durch Zentrifugation. Die zu spendenden Blutkomponenten werden gesammelt und die übrigen Bestandteile an den Spender zurückgegeben. Neben der Spende einer einzelnen Blutkomponente sind über dieses Verfahren auch Multikomponentenspenden möglich. Nachteilig an der Apheresespende ist die längere Spendedauer, die je nach Zellart einige Stunden in Anspruch nehmen kann (Kiefel 2010).

2.3.4. Thrombozytenspende

Thrombozyten können im Rahmen einer Vollblutspende oder über die Thrombozytenapherese gespendet werden. Bei der Vollblutspende werden die Thrombozytenkonzentrate entweder aus plättchenreichem Plasma (PRP) oder aus „buffy coat“ gewonnen.

„Buffy coat“ entsteht bei der Weiterverarbeitung von Vollblut. Zur Herstellung von Thrombozytenkonzentraten werden 4 bis 6 „buffy coat“ Beutel von AB0-gleichen Spendern zusammengeführt. Das Gemisch wird mit autologem Plasma eines Spenders oder einer Additivlösung versetzt. Nach einer erneuten Zentrifugation werden die Leukozyten durch einen Depletionsfilter aus dem Gemisch entfernt. Das entstandene Präparat wird gesammelt und als leukozytendepletiertes Pool-Thrombozytenkonzentrat bezeichnet. Es enthält dann eine Standarddosis Thrombozyten für Erwachsene, bei weniger als 1×10^6 Leukozyten (Kiefel 2010).

Bei der in den USA bevorzugten Herstellung aus plättchenreichem Plasma, werden die Thrombozyten vom plättchenarmen Plasma durch hochtourige Zentrifugation getrennt. 1 bis 2 Stunden später werden die sedimentierten Thrombozyten wieder in Lösung gebracht. Diese

Methode hat jedoch eine verstärkte Plättchenaktivierung zur Folge, welches sich in einer erhöhten Ausbildung von GPIIb/IIIa Rezeptoren äußert (Kiefel 2010).

Der Stellenwert der Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten aus Vollblut ist heutzutage gering. 2008 entfielen in den USA lediglich 16,3% auf diesen Herstellungsweg. 83,7% der produzierten Thrombozytenkonzentrate hingegen wurden durch die Thrombozytenapherese gewonnen (Whitaker et al. 2011).

Die Thrombozytenapherese wird als kontinuierliche oder diskontinuierliche Spende durchgeführt. Beide Verfahren unterscheiden sich im Wesentlichen nur durch den zeitlichen Ablauf der Zentrifugation. Bei der kontinuierlichen Apherese erfolgt die Auftrennung und Zentrifugation des entnommenen Vollblutes konstant über die gesamte Spende hinweg. Während der Rückführungsphase gewährleistet ein extrakorporales Reservoir die Aufrechterhaltung des Blutzustroms. Im Gegensatz dazu verläuft die Auftrennung beim diskontinuierlichen Verfahren sequentiell. Aufbau bedingt, kommt es hierbei während der Rückführungsphase immer zu einer Unterbrechung der Zentrifugation, die erst nach Abschluss von Rück- und Zufluss erneut beginnt. Am Ende einer Spende sollte das Thrombozytenapheresekonzentrat $2-4 \times 10^{11}$ Thrombozyten, weniger als 3×10^9 Erythrozyten und maximal 1×10^6 Leukozyten enthalten (Kiefel 2010). Der mit der Spende assoziierte Verlust an Blutplättchen liegt zwischen 20 und 29% von der Gesamtthrombozytenzahl (Winters 2006).

Eine Verminderung anderer zellulärer Blutbestandteile neben den Thrombozyten ist zwar gering, aber messbar. Die Autorengruppe um Das führte in einer aktuellen Studie eine Analyse der Spenderblutwerte vor und nach einer Thrombozytenapherese durch. Je nach Apheresegerät sank nach einer Spende der Hb um 0,8 bis 1,3 g/dl, der Hk um 2,1 bis 2,9% und der WBC um 0,9 bis $1,4 \times 10^3/\mu\text{l}$, gegenüber dem Ausgangswert. Die Konzentration der Blutplättchen verringerte sich um 61,6 bis $77,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ und lag nach einer Spende zwischen 133 und $153 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Das et al. 2009).

Tendulkar und Rajadhyaksha kamen in ihrer auch 2009 veröffentlichten Arbeit auf geringere Verlustwerte. Bei ihren drei getesteten Apheresegeräten lag die Verminderung des Hb zwischen 0,3 und 0,7 g/dl, die des Hk zwischen 1,0 und 2,2% und der WBC um 0,5 bis $0,6 \times 10^3/\mu\text{l}$. Der Plättchenverlust lag zwischen 70 und $82,4 \times 10^3/\mu\text{l}$, wobei die Konzentration an keinem Gerät unter $150 \times 10^3/\mu\text{l}$ fiel (Tendulkar und Rajadhyaksha 2009).

Beide Studien verdeutlichen, dass trotz einer hochselektiven Spende von Thrombozyten bei der Apherese auch andere Blutbestandteile verloren gehen. Die Konsequenz daraus ist eine Limitierung der Spendefrequenz und Überwachung der Spenderblutwerte (Kiefel 2010).

Das Gesamtvolumen pro Spende ist auf 750ml, inklusive Antikoagulans, beschränkt. In Deutschland dürfen pro Jahr maximal 26 Thrombozytenapheresen pro Spender durchgeführt werden. Es können dabei sequentielle Spenden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt werden. Die nächste Spende nach einem solchen Zyklus ist erst 14 Tage und ein weitere 5er Sequenz nach 3 Monaten möglich (Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut 2010).

Das Blutspendezentrum der Universitätsklinik Jena verwendet für die Thrombozytenapherese ein Trima accel der Firma CaridianBCT. Die Apherese läuft bei diesem Gerät als kontinuierliches single needle Verfahren ab.

2.3.5. Anforderungen an den Spender

Um Blut spenden zu können müssen die potentiellen Spender grundlegende Anforderungen erfüllen. Dies sind ein Alter von 18 bis 68 Jahren, eine unauffällige Organ-, Infektions- und Suchtanamnese, sowie ein subjektives Wohlbefinden. Diese Angaben muss der Spender mit seiner Unterschrift bestätigen. Weiterhin wird die Tauglichkeit der Person für eine Blutspende durch einen Arzt untersucht. Anforderungen an den Spender sind ein Körpergewicht von mindestens 50kg, ein Blutdruck zwischen 100 - 180mmHg systolisch und höchstens 100mmHg in der Diastole. Der Puls muss regelmäßig sein und sollte zwischen 50 - 100 Schlägen pro Minute liegen. Der Spender darf kein Fieber oder sonstige Krankheitszeichen aufweisen. Seitens der Blutwerte müssen Frauen einen Hb von mindestens 12,5g/dl bzw. einen Hk größer 38% aufweisen. Für Männer gelten Grenzwerte von 13,5g/dl bzw. 40%. Die Thrombozytenapherese stellt zusätzliche Anforderungen an die Spender. Die Thrombozytenzahl muss mindestens $150 \times 10^3/\mu\text{l}$ betragen. Weiterhin darf der Spender keine Medikamente eingenommen haben die die Funktion der Blutplättchen beeinträchtigen. Hierunter zählen besonders Aggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure, Clopidogrel oder Abciximab (Kiefel 2010).

2.3.6. Komplikationen & Langzeitfolgen der Blutspende

Die Blutspende ist ein invasiver Eingriff am Menschen. Wie jeder Eingriff ist auch die Blutspende mit einem gewissen, wenn auch geringen, Komplikationsrisiko vergesellschaftet. Allgemein können dies Kreislaufstörungen, mit der Gefahr einer Synkope und Sturz, Hämatombildung im Bereich der Punktionsstelle und sehr selten eine Nervenverletzung oder Ausbildung einer arteriovenösen Fistel durch Fehlpunktion sein (Kiefel 2010).

Komplikationen insgesamt treten bei der Apherese im Vergleich zur Vollblutspende seltener auf. Jedoch zeigen verschiedene Studien, dass schwerere Komplikationen bei der Apherese häufiger vorkommen als bei der Vollblutspende (Winters 2006).

Akute Zwischenfälle bei der Thrombozytenapherese beziehen sich zumeist auf die Citratnebenwirkungen. Diese Substanz wird im extrakorporalen Kreislauf der Aphereseapparatur als Antikoagulans verwendet und wirkt über die Bindung von Kalziumionen. Bei der Reinfusion des plättchendepletierten Blutes gelangt ein Teil des Citrats in den menschlichen Kreislauf. Nebenwirkung sind typischerweise periorale und akrale Parästhesien, ein metallischer Geschmack, aber auch Muskelspasmen, eine leichte Benommenheit und Verlängerung des QT-Intervalls. Diese können jedoch durch Drosselung der Reinfusionsgeschwindigkeit oder oraler, notfalls intravenöser, Gabe von Kalzium und Magnesium gut behandelt werden. Allergische Reaktionen auf Ethylene, welche zur Reinigung der Apheresesets genutzt werden, können von Hautjucken und Quaddelbildung bis zum lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock variieren. Ihr Auftreten ist aber sehr selten bei Thrombozytenspendern. Blutungszwischenfälle aufgrund der Spende bedingten Thrombozytendepletion werden nicht beobachtet (Winters 2006).

Die Langzeitfolgen der Thrombozytenspende wurden seit der Einführung der selektiven Apheresespende immer wieder untersucht. In den ersten Jahren war die Plättchenapherese mit einem hohen Verlust von weißen Blutkörperchen, insbesondere Lymphozyten, assoziiert. Man befürchtete hierdurch ein Immundefizit zu induzieren (Strauss 1984). Durch verbesserte Spendetechniken konnte diese Nebenwirkung deutlich reduziert werden (Lewis et al. 1997).

Mit zunehmenden Erkenntnissen im Bereich der hämatopoetischen Stammzellen kam die Frage der Beeinträchtigung der Thrombopoese durch die Thrombozytenapherese auf. Die Diskussion diesbezüglich wird sehr kontrovers geführt. Stohlawetz et al. stellte eine geringere Anzahl junger, retikulierter Thrombozyten bei chronischen Spendern fest. Die Zahl reifer

Blutplättchen war davon nicht betroffen (Stohlawetz et al. 1998). Eine Reduktion um 10 bis 20% der Plättchen im peripheren Blut wiesen Lazarus und Kollegen bei Langzeitthrombozytenspendern nach. Dies führte bei 8,5% ihrer Studienpopulation zu einer zeitweiligen Ablehnung für eine weitere Plättchenspende, da diese Spender eine Thrombozytenkonzentration von weniger als $150 \times 10^3/\mu\text{l}$ aufwiesen (Lazarus et al. 2001). Andererseits gibt es auch einige Gegenstudien die einen solchen Plättchenverlust nicht nachweisen konnten (Katz et al. 2007) oder sogar eine geringe Steigerung der Thrombozytenkonzentration zeigten (Richa et al. 2008).

Eine ganz andere Langzeitfolge scheint die Gruppe um Karin Amrein aus Graz aufgedeckt zu haben. Sie konnten nachweisen, dass Langzeitthrombozytenspender im Vergleich zur nicht spendenden Kontrollgruppe eine verminderte Knochendichte in der lumbalen Wirbelsäule aufwiesen. Weiterhin stellten sie eine verminderte Kalzium-, Albumin und Vitamin D3 Konzentration fest. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die wiederkehrende Exposition gegenüber Citrat während der Apherese die Mineralisierung und den Metabolismus des Knochens beeinträchtigt (Amrein et al. 2010).

2.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird im Allgemeinen auch als FACS Analyse bezeichnet. FACS steht dabei für den englischen Begriff „fluorescence activated cell sorting“. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Abkürzung FACS ein urheberrechtlich geschützter Markenname der Firma BD Bioscience ist. Allgemein gesehen ist das für die FACS Analyse verwendete Gerät ein Durchflusszytometer.

Ein Durchflusszytometer besteht aus einer Lichtquelle, fokussierenden Linsen, einem Flüssigkeitskammersystem, verschiedenen Filtern, Lichtdetektoren und Verstärkern, sowie einem Computer zur Analyse und grafischen Darstellung der Daten. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 6 dargestellt.

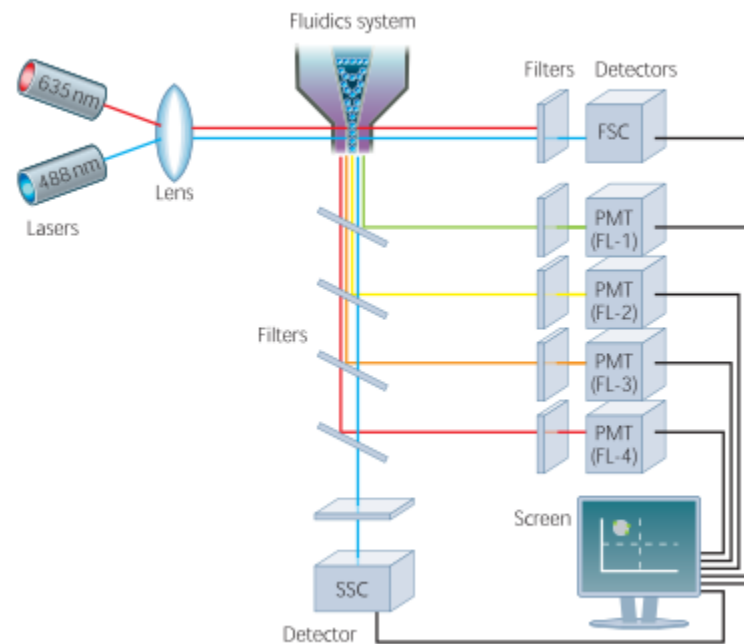


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (Rahman 2006).

Um die Zellen einer heterogenen Suspension einzeln analysieren zu können, kommt das Prinzip der hydrodynamischen Fixierung zur Anwendung. Dabei werden Zellen einer Probe durch einen Wasserstrom räumlich in einen Strom einzelner Zellen geordnet. Dies geschieht durch eine Zwei-Kammerkonstruktion, welche in Abbildung 7 dargestellt ist. In der Außenkammer befindet sich eine schnell fließende Spülflüssigkeit. Die Innenkammer, welche sich konisch verjüngt, öffnet sich am Ende in die Außenkammer. In ihr fließt ein langsamerer Strom der zu analysierenden Zellsuspension. Bedingt durch die schnellere Strömung der Spülflüssigkeit und die Form der Innenkammer entsteht ein starker Sog am Ausgang der Innenkammer. Dadurch wird im Idealfall eine laminare Strömung erzeugt, welche die Zellsuspension in einen Strom aus Einzelzellen auftrennt.

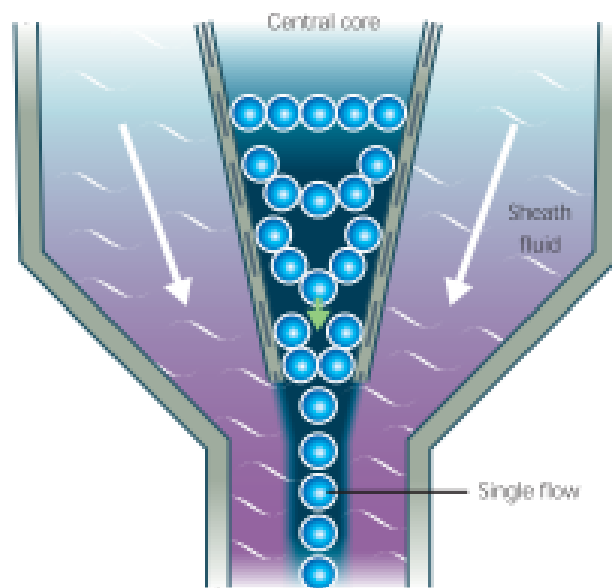


Abbildung 7: Kammeraufbau zur hydrodynamischen Fixierung (Rahman 2006).

Im nächsten Schritt erfolgt die optische Vermessung. Als Lichtquelle dienen zumeist ein oder mehrere Laser. Diese sind in ihrer Anschaffung teuer, haben aber den Vorteil, monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge zu erzeugen. Alternativ kann eine Lichtbogenlampe zur Anwendung kommen. Sie ist etwas günstiger, produziert jedoch Licht unterschiedlicher Wellenlängen, welches einer zusätzlichen optischen Filtration bedarf.

Die Einzelzellen fließen nach der hydrodynamischen Fokussierung durch ein oder mehrere Lichtstrahlen. Beim Auftreffen der Strahlen kommt es zur Lichtstreuung und Fluoreszenzemission, insofern die Zelle zuvor entsprechend markiert wurde.

Das Streulicht wird von zwei verschiedenen Photodektorsystemen gemessen. Der sogenannte „forward scatter channel“ (FSC) misst das Licht, welches eine Achsenabweichung vom Lichtstrahl von bis zu 20° hat. Die Intensität des gemessenen Lichtes gibt dabei Hinweise auf die Zellgröße. Das zweite System, der „side scatter channel“ (SSC), erkennt das Licht mit einer Streuung von circa 90° . Es erlaubt eine Aussage über die Granularität der analysierten Partikel. Die Kombination von FSC und SSC ermöglicht die Differenzierung einzelner Zellen in einer heterogenen Zellsuspension.

Für die Fluoreszenzmessung gibt es, je nach Hersteller, eine unterschiedliche Anzahl weiterer, separater Fluoreszenzdetektoren (FL-). Für diese Art von Messung müssen

Oberflächenrezeptoren oder auch intrazelluläre Moleküle zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden sein.

Um eine hohe Genauigkeit der Messung zu gewährleisten, sind jedem Photodetektor optische Filter vorgeschaltet. Diese blockieren bestimmte Wellenlängen des Lichts durch Absorption. Die Hauptvertreter dieser Filter sind der „long pass“, der „short pass“ und der „band pass“ Filter. Der „long pass“ lässt nur Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge hindurch. Der „short pass“ stellt das Gegenstück dar und lässt Licht nur unterhalb einer bestimmten Wellenlänge passieren. Der „band pass“ hingegen besitzt ein Fenster für einen genau bestimmten, engen Wellenlängenbereich.

Zur Verarbeitung des Lichtsignals bedarf es noch den bereits erwähnten Photodetektoren. Fällt ein Lichtstrahl nach dem Durchlaufen des Filters auf einen Photodetektor erzeugt er dabei Spannung. Die Stärke des erhaltenen Signals ist linear proportional zur Anzahl der auftreffenden Lichtphotonen. Dadurch ist neben der quantitativen Analyse eine qualitative möglich. Die Datenverarbeitung und grafische Darstellung übernimmt ein angeschlossener Computer (Rahman 2006).

2.5. Fluoreszenzanalyse bei der Durchflusszytometrie

Größe und Granularität sind wichtige Unterscheidungsmerkmale. Sie erlauben eine erste Differenzierung der Zellen in einer heterogenen Analysesuspension (Abbildung 8).

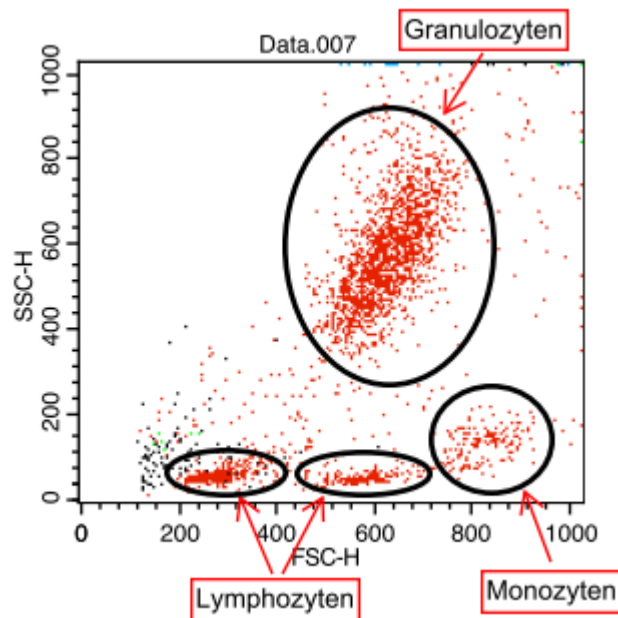


Abbildung 8: Grafische Darstellung einer Zellanalyse im FACS. Jeder Punkt entspricht einer Zelle. Diese sind nach Volumen (FSC) und Granularität (SSC) aufgetragen, wodurch eine Abgrenzung einzelner Populationen möglich ist.

Zur Subklassifizierung der Zellpopulationen werden weitere, spezifischere Marker benötigt. Hierfür besonders geeignet sind charakteristische Oberflächenmoleküle, die nur von bestimmten Zellen exprimiert werden. Um deren Vorhandensein nachzuweisen, müssen sie gesondert markiert werden. Hierzu eignen sich Antikörper, welche ein spezifisches Oberflächenmolekül erkennen und selektiv daran binden.

Das Durchflusszytometer kann die gebundenen Antikörper nicht direkt erkennen. Deshalb müssen sie zuvor mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert werden. Die Fluoreszenzemission wird über separate Detektoren gemessen.

Für die Fluoreszenzmarkierung existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Farbstoffe. Sie absorbieren Licht, um aus der gewonnenen Energie selber Licht zu emittieren. Jeder Farbstoff bedient dabei eine für ihn spezifische Wellenlänge, in welcher dieser die höchste Lichtabsorption und -emission aufweist.

Aus physikalischer Sicht absorbieren die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes die Lichtenergie. Sie nutzen diese um aus ihrem Ruhestadium in ein höherenergetisches Niveau zu springen. Dieser angeregte Zustand ist instabil. Bereits nach wenigen Nanosekunden geben die Elektronen die aufgenommene Energie wieder in Form von Wärme und Licht ab. Sie springen von ihrem energetisch höheren Orbital zurück auf ihr stabiles Ruheorbital. Das dabei frei werdende Licht ist aufgrund der Wärmeabgabe immer energetisch ärmer, als das zuvor absorbierte und besitzt damit eine größere Wellenlänge.

Wichtig für die Wahl der Farbstoffe ist die im Durchflusszytometer verwendete Lichtquelle. Da die Lichtemission abhängig von der aufgenommenen Energie ist, sollte diese Licht im Spektrum der maximalen Absorption des Fluoreszenzfarbstoffes aussenden. Dies hätte eine maximale Anregung der Elektronen und damit das bestmögliche Lichtsignal zur Folge.

Es gibt eine ganze Reihe unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe mit spezifischen Emissionswerten. Dies eröffnet die Möglichkeit, unterschiedliche Marker miteinander zu kombinieren und Zellen auf mehrere verschiedene Oberflächenmoleküle gleichzeitig zu untersuchen (Rahman 2006).

3. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Blutprodukte finden ein breites Anwendungsspektrum in der modernen Medizin. Um eine kontinuierliche Versorgung zu gewährleisten ist ein konstant hohes Spendeaufkommen von Nöten. Hierbei stehen Dauerspender, die einen großen Anteil am gespendeten Gesamtvolumen haben, besonders im Fokus.

Die Thrombozytenapherese geht jedoch mit einer physischen Belastung für den Spender einher. Neben dem Verlust von Blutplättchen und wenigen Leukozyten, können zurück transfundierte Zellen bei der Separation geschädigt worden sein. Citrat kann in den Spenderkreislauf gelangen und Nebenwirkungen verursachen. Der Rückfluss nicht benötigter Blutkomponenten führt zu einem Endothelscherstress und einer geringen lokalen Entzündungsreaktion.

Angesichts dieser Begleiterscheinungen einer Thrombozytenapheresespende stellt sich die Frage der langfristigen Spendersicherheit.

Eine grundlegende Frage ist dabei, ob die chronische Belastung einer Thrombozytenlangzeitspende zu einer quantitativen Veränderung der Thrombozytenzahl führt?

Obwohl die Thrombozytenapheresespende ein hochselektives Spendeverfahren ist gehen auch andere Blutkomponenten dabei verloren. Kann daher, langfristig gesehen, eine Verminderung dieser zellulären Blutbestandteile nachgewiesen werden?

Andererseits stellt sich die Frage, ob der wiederkehrende Stimulus zur Neubildung der verloren gegangenen Blutbestandteile eine Veränderung des Stammzellniveaus bedingen kann? Kommt es dadurch bei der Thrombozytenapherespende zu einer Adaptation der Thrombozyten bildenden Zellen oder erschöpfen sich diese?

Das Verfahren der Apheresespende kann, je nach gespendeter Blutkomponente, bis zu mehrere Stunden aus alternierenden Blutabnahmen und Rücktransfusion andauern.

Bezogen auf eine Langzeitspende könnte diese dauerhafte Reizung des Gefäßendothels eine Induktion von endothelialen Progenitorzellen bewirken.

Abschließend ist zu hinterfragen, ob mögliche Veränderungen auf zellulärem Niveau eine Auswirkung auf den Spender haben können.

4. Material und Methoden

4.1. Lösungen & Antikörper

4.1.1. PBS

PBS, vom Englischen „phosphat buffered saline“, ist eine zum menschlichen Organismus isotone, phosphatgepufferte Salzlösung. Diese Zusammensetzung aus verschiedenen Salzen ermöglicht ein Arbeiten unter einem konstanten pH-Wert von 7,4. Hierdurch ist eine Anwendung bei der Untersuchung von menschlichen Zellen für diese unschädlich. Ein Liter der Lösung enthält 8,0g Natriumchlorid, 0,2g Kaliumchlorid, 1,44g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat und 0,24g Kaliumdihydrogenphosphat (Institut für Transfusionsmedizin Universität Jena 2008).

4.1.2. FACS Lysing Solution

Dieser Lysepuffer wird von der Firma BD Biosciences hergestellt. Vor der Analyse einer Blutprobe mittels Durchflusszytometer dient dieser dem Auflösen roter Blutkörperchen (BD Biosciences 2010). Die Lysepufferlösung wurde vor jeder Analyseprozedur frisch zubereitet. Hierfür wurden in einem 20ml Falcon destilliertes Wasser mit BD-Lysing Solution im Verhältnis 10:1 gemischt.

4.1.3. FcR Blocking Reagent human

Die FcR Blocking Reagent human der Firma Miltenyi Biotec dient der Prävention von unspezifischen Bindungen zwischen der konstanten Domäne der Antikörper und den Fc-Rezeptoren, welche ubiquitär auf verschiedenen Zellen vorkommen. Das Reagenz bindet an die Fc-Rezeptoren und sättigt deren Bindungsfähigkeit ab. Dies vermindert die Verfälschung der Messung durch unspezifische Antikörperbindung (Miltenyi Biotec 2007a).

4.1.4. RPE Fluoreszenzkit

Das RPE Conjugation Kit der Firma AbD Serotec wird für die Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern oder Proteinen mit R-Phycoerythrin (PE) verwendet. Das Kit LNK023RPE enthält ein Fläschchen mit 1mg LYNX lyophilized RPE mix, eins mit LYNX Modifier reagent und ein weiteres mit LYNX Quencher reagent. Die Anwendung erfolgte nach den Vorgaben der beigelegten Verwendungshinweise (AbD Serotec 2009).

4.1.5. FACSFlow Sheath Fluid

Es handelt sich um eine Spülflüssigkeit, welche bei Messungen mit einem Durchflusszytometer verwendet werden kann.

4.1.6. CD110-PE

CD110-PE ist ein R-phycoerythrin (PE) fluoreszenzmarkierter, monoklonaler Antikörper gegen den humanen Thrombopoietinrezeptor. Dieser Rezeptor wird nach CD-Nomenklatur als CD110 bezeichnet. Der unkonjugierte Antikörper wird von der Firma R&D Systems Inc. hergestellt und ist unter dem Namen Monoclonal Anti-human Thrombopoietin R Antibody erhältlich (R&D Systems Inc. 2009). Mit Hilfe des Konjugationskits der Firma AbD Serotec wurde der CD110 Antikörper mit R-Phycoerythrin markiert (AbD Serotec 2009). Die spezifischen Absorptionsmaxima für PE liegen bei einer Wellenlänge von 490nm und 565nm. PE emittiert gelbes Licht mit einem Maximum bei 578nm (Rahman 2006).

4.1.7. CD133-PE

CD133-PE ist ein PE fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper gegen humanes CD133. Der Antikörper wird von Miltenyi Biotec hergestellt und ist als CD133/2 (293C3)-PE antibody human erhältlich (Miltenyi Biotec 2007b). Es handelt sich um den gleichen Fluoreszenzfarbstoff mit denselben Spezifika wie unter CD110-PE beschrieben.

4.1.8. CD45-FITC

CD45-FITC ist ein mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) fluoreszenzmarkierter, monoklonaler Antikörper gegen humanes CD45, welcher selektiv an alle CD45 Isoformen bindet. Dieser Antikörper wird von der Firma ImmunoTools GmbH produziert und als anti-human CD45 FITC-conjugated vertrieben (ImmunoTools). FITC nimmt Licht bei einer Wellenlänge von 490nm am Stärksten auf und gibt grünes Licht mit 525nm ab (Rahman 2006).

4.1.9. CD34-APC

Es handelt sich um einen Allophycocyanin (APC) markierten Antikörper gegen das humane CD34 Oberflächenantigen. Unter der Bezeichnung APC Mouse Anti-Human CD34 wird das Produkt von der Firma BD Biosciences verkauft (BD Biosciences 2011). APC ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem spezifischen Lichtabsorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 650nm und einem Emissionsmaximum von 661nm. Das emittierte Licht ist violett (Rahman 2006).

4.1.10. VEGFR2-PerCP

Dieser gegen humane Rezeptoren des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) gerichtete monoklonale Antikörper ist mit Peridinin-Chlorophyll-Protein-Complex (PerCP) fluoreszenzmarkiert. Das Präparat der Firma R&D Systems Inc. ist unter dem Namen Monoklonal Anti-human VEGF R2-PerCP erhältlich (R&D Systems Inc. 2008). Für PerCP sind ein charakteristisches Absorptionsmaximum von 490nm und ein Emissionsmaximum von 675nm beschrieben, wobei das emittierte Licht rot erscheint (Rahman 2006).

4.2. Probanden

In diese Studie wurden Personen eingeschlossen, welche sich im Zeitraum vom 21.10.2009 bis 10.12.2009 im Blutspendezentrum der Universitätsklinik Jena zur Blutspende vorstellten. Die Probanden mussten für die Spende mindestens 18 Jahre alt sein, der wissenschaftlichen

Untersuchung ihrer Blutproben im Vorhinein zustimmen und die allgemeinen Spenderanforderungen (siehe 2.3.5) erfüllen.

Es wurden Selektionskriterien für zwei verschiedene Spendergruppen festgelegt.

Die erste Gruppe besteht aus Langzeitthrombozytenspendern (LS). Diese mussten vor dem Zeitpunkt ihrer Spende mindestens 10 Thrombozytenspenden zwischen 2009 und 2008 geleistet haben. Als Vergleichsgruppe dienten Vollblutspender, die sich zu ihrer Erstspende vorstellten (ES).

Die Anzahl der zuvor geleisteten Blutspenden wurde, über die Datenbank des Institutes für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Jena, bis einschließlich 1994 zurückverfolgt. Für die Gruppe der Langzeitthrombozytenspenden wurden zusätzlich die Anzahl der Thrombozytenspenden, getrennt nach Einzel- und Doppelspende, sowie die geleisteten Plasma- und Vollblutspenden erfasst. Die Spende zum Zeitpunkt der Vorstellung wurde nicht berücksichtigt.

Die dieser Studie zugrunde liegenden Blutproben wurden vor der eigentlichen Blutspende gewonnen. Die Abnahme erfolgte durch eine medizinisch technische Assistentin aus der Cubitalvene des Probanden. Hierbei wurden jeweils 2,5ml Vollblut in ein EDTA Röhrchen der Firma Sarstedt abgenommen. Im Anschluss erfolgte der Transport vom Blutspendezentrum in der Stoystraße in das Laborzentrum Lobeda Ost in Jena. Alle Proben wurden innerhalb von 6 Stunden nach Abnahme verarbeitet.

Die Bestimmung des der Auswertung zugrunde liegenden Blutbildes wurde je nach Spendergruppe zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt durchgeführt. Die Werte der LS stammen aus der Datenbank des Instituts für Transfusionsmedizin der Universität Jena. Diese Analysen wurden direkt vor der Thrombozytenapherese von den medizinisch technischen Assistenten vor Ort mit einem Sysmex KX-21N durchgeführt. Die Bestimmung der Blutwerte der ES erfolgte im Rahmen der Probenbearbeitung und Analyse. Auch hier kam ein Sysmex KX-21N zum Einsatz. Variierende Maßeinheiten für Hb, MCH und MCHC zwischen beiden Analysegruppen wurden für die Datenbank dieser Arbeit mit folgenden Umrechnungsfaktoren auf SI-Einheiten umgerechnet (Sysmex 2006).

Für Hb und MCHC:

$$\text{g/dl} \times 0,6206 = \text{mmol}$$

Für MCH:

$$\text{pg} \times 0,06206 = \text{fmol}$$

4.3. Vorbereitung und Probenverarbeitung

4.3.1. PE-Markierung des CD110

Zwei Tage vor der Verarbeitung der ersten Blutproben erfolgte die Fluoreszenzmarkierung des CD110 Antikörpers. Dem Protokoll folgend wurden 500µg des kristallinen CD110 Antikörpers in 1000µl sterilem PBS behutsam in Lösung gebracht. Als nächstes wurden 100µl LYNX Modifier reagent hinzugefügt und zweifach resuspendiert um ein gleichmäßiges Vermischen zu ermöglichen. Danach wurden 1000µg lyophilized RPE mit den 1100µl Antikörper-LYNX-Lösung versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte der Zusatz von 100µl LYNX-Quencher und nach kurzem Aufschütteln eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die danach einsatzbereite, PE fluoreszenzmarkierte Antikörperlösung wurde bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert.

4.3.2. Probenverarbeitung

Für die eigentliche Analyse wurden die Blutproben wie folgt bearbeitet.

Im ersten Schritt erfolgte die Aufteilung einer Blutprobe auf zwei Untersuchungsröhrchen. Dies war notwendig um eine spätere Signalüberschneidung der beiden PE-fluoreszenzmarkierten Antikörper, gegen CD110 beziehungsweise CD133, zu verhindern. Aus einem Blutröhrchen wurde dabei jeweils 400µl EDTA-Vollblut in zwei FACS-Röhrchen der Firma BD Biosciences pipettiert. Die FACS-Röhrchen wurden mit A, beziehungsweise B, sowie der Probennummer beschriftet. Im Folgenden wurden den 400µl EDTA-Vollblut 10µl FcR Blocking-Reagenz hinzugefügt und diese kurz aufgeschüttelt. Nach zehn minütiger Inkubationszeit folgte die Hinzugabe der fluoreszenzmarkierten Antikörperlösungen.

Hierbei wurden für die A-Röhrchen 5µl CD133-PE, 5µl CD45-FITC, 5µl VEGFR-2 PerCP und 5µl CD34-APC verwendet. Den Röhrchen der B-Reihe wurden 5µl CD45-FITC, 5µl CD34-APC und 10µl CD110-PE zugesetzt.

Die Röhrchen wurden daraufhin weitere 15 Minuten inkubiert, zuvor und danach jeweils kurz aufgeschüttelt. Im nächsten Schritt wurden alle Proben gleichmäßig auf jeweils 2 Röhrchen zu 215µl aufgeteilt und entsprechend mit *.1 beziehungsweise *.2 beschriftet.

Als nächstes folgte nun die Lyse der Blutproben. Dazu wurde jedem Röhrchen 2ml des zuvor hergestellten Lysepuffers zugesetzt, die Mischung kurz aufgeschüttelt und für mindestens 2 Minuten inkubiert, bis die Lösung vollständig aufklarte.

Um die verbliebenen Granulozyten und Lymphozyten von den restlichen Blutbestandteilen zu trennen wurden mehrere Waschvorgänge durchgeführt. Dabei wurde den Proben jeweils 2ml FACS-Flow Lösung hinzugefügt und die Röhrchen nach kurzem Aufschütteln zentrifugiert.

Wir verwendeten hierfür eine Rotina 35 Tischzentrifuge der Firma Hettich bei 350G für 8min.

Nach diesem ersten Waschvorgang wurde der Flüssigkeitsüberstand in den Probenröhrchen vorsichtig ausgeschüttet und ausgeklopft. Es folgte ein weiterer Waschschrift, wofür den Röhrchen jeweils 4ml FACS-Flow Lösung hinzugefügt wurde. Nach kurzem Aufschütteln folgte erneut eine Zentrifugation der Lösungen unter Verwendung derselben Einstellung wie im ersten Waschvorgang. Auch dieser folgte das vorsichtige Ausschütten und Ausklopfen der Flüssigkeitsüberstände.

In Vorbereitung auf die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellüberstände am Boden der FACS-Röhrchen erneut in Lösung gebracht und die Proben der jeweiligen Untergruppen *.1 und *.2 in einem Röhrchen vereinigt.

Hierfür wurden zuerst jeweils die Zellüberstände der *.2 Röhrchen mit 200µl FACS-Flow in Lösung gebracht und aufgeschüttelt. Das entstandene Eluat verwendeten wir um die Probe des entsprechenden *.1 Röhrchen derselben Testreihe in Lösung zu bringen. Dazu wurden die 200µl Eluat des *.2 Röhrchens vorsichtig in das entsprechende *.1 Röhrchen pipettiert und im Anschluss kurz aufgeschüttelt. Am Ende einer solchen Prozedur enthielten nur noch die *.1 Röhrchen der jeweiligen Testreihe die aufgearbeitete Probe.

Anzumerken ist, dass nicht alle Proben nach diesem Schema bearbeitet werden konnten. Für einige Ansätze war der CD45 Antikörper nicht verfügbar. CD45 diente in dieser Studie jedoch nur als Selektionsparameter und nicht als Zielgröße. Die statistische Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung dieser Varianz.

4.4. FACS Analyse und Auswertung

Die Analyse der Proben wurde an einem Durchflusszytometer FACS Calibur der Firma BD durchgeführt. Es besitzt zwei Laser und kann vier Fluoreszenzen gleichzeitig messen.

In der Tabelle 1 sowie der Tabelle 2 sind die Einstellungen der Fluoreszenzkanäle am Durchflusszytometer dargestellt.

Antikörper	CD34-APC	CD45-FITC	CD133-PE	VEGFR2-PerCP
Fluoreszenzkanal	FL-4	FL-1	FL-2	FL-3

Tabelle 1: Röhrchen A Konfiguration der FACS Fluoreszenzkanäle.

Antikörper	CD34-APC	CD45-FITC	CD110-PE
Fluoreszenzkanal	FL-4	FL-1	FL-2

Tabelle 2: Röhrchen B. Konfiguration der FACS Fluoreszenzkanäle.

Die Messergebnisse wurden mit der Software CellQuest Pro Version 5.2.1 der Firma BD Biosciences ausgewertet.

Hierfür wurde jeweils eine Maske für die Reihe mit CD133 sowie CD110 erstellt. Da einige Messungen ohne CD45 Markierung durchgeführt wurden, erfolgte für diese Proben eine entsprechende Anpassung der Vorlage. Als Grenzwert zur Beendigung der Messung wählten wir 50000 Ereignisse pro Probe im Gate 1. Bei Proben ohne CD45 Markierung setzen wir ein Zeitlimit von 10 Sekunden pro Analyse.

Im Gate 1 wurden die Leukozyten gegenüber anderen Zellresten abgegrenzt. Möglich ist dies durch die typische Verteilung der weißen Zellen in einer graphischen Auftragung aus der

Konzentration von fluoreszenzmarkiertem CD45 und der Zellgranularität im SSC. Beispielhaft ist in Abbildung 9 eine Probe mit CD45 dargestellt, das Gate 1 ist mit R1 markiert.

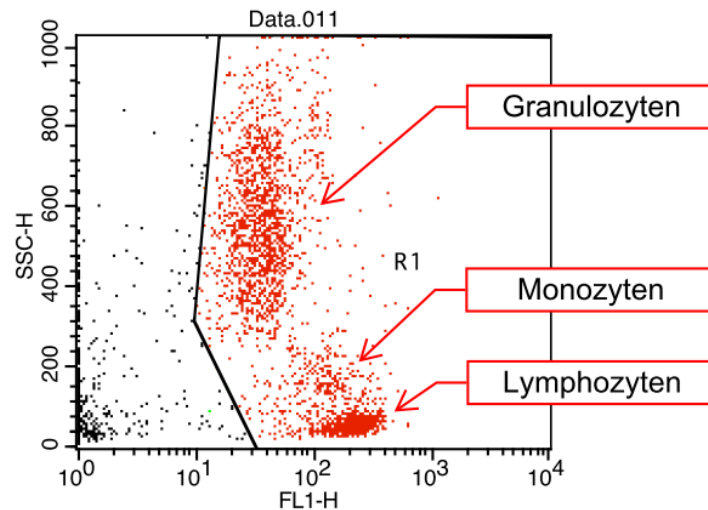


Abbildung 9: Graphische Darstellung von CD45 positiven Zellen (X-Achse) zu deren Granularität (SSC). Rot markiert sind die als Gate 1 ausgewählten Leukozyten.

In Proben ohne CD45 wurden die Leukozyten anhand ihrer Verteilung im FSC/SSC Graphen ausgewählt. Der FSC dient zur Messung des Zellvolumens. Wie in Abbildung 10 dargestellt, sind die einzelnen Zellpopulationen auch bei dieser Darstellung deutlich diskriminierbar.

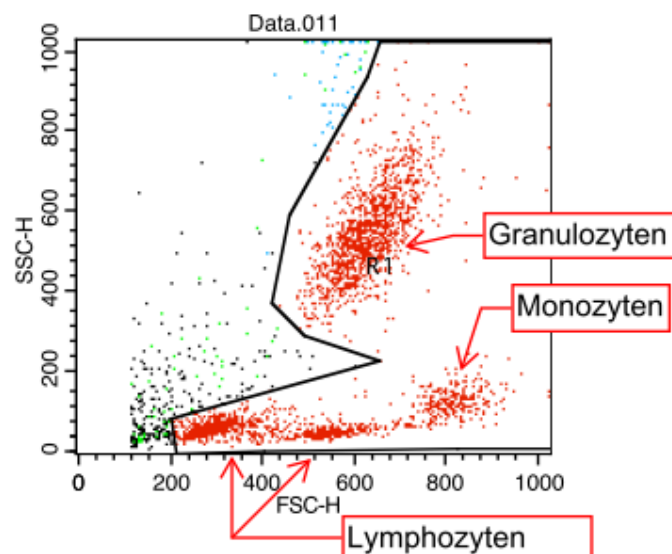


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Messergebnisse im FSC- (X-Achse) zum SSC-Graphen (Y-Achse). Rot markiert sind die als Gate 1 ausgewählten Leukozyten.

Aus dieser vorselektierten Zellpopulation im Gate 1 heraus wurden die weiteren Oberflächenantigene dargestellt.

Über die Auftragung von FL-1 zu FL-4 wurden CD34 und CD45 positive Zellen als Region 2 ausgewählt. Im Gegensatz zu allen anderen Markern war hierbei die Abgrenzung einer einzelnen Zellpopulation nur schwer möglich. Bei Proben mit markiertem CD45 ließ sich in höheren CD34 Konzentrationen eine Einkerbung in der Zellmasse ausmachen (Abbildung 11). Die untere Grenze der Region 2 wurde stets knapp unterhalb dieser Einkerbung gesetzt, um eine interindividuelle Vergleichbarkeit zu erzielen.

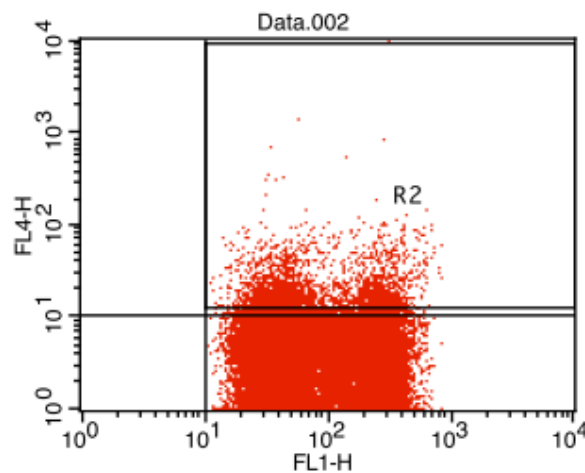


Abbildung 11: CD45/CD34 Graph mit der Auswahl der Region 2. Diese Grafik ist beispielhaft für Proben mit CD45.

In Ansätzen ohne fluoreszenzmarkiertem CD45 ließ sich diese konstante Kerbe nicht auffinden. Um dennoch eine einheitliche individuelle Auswertung zu ermöglichen, wurde die Zahl der angezeigten Ereignisse verringert. Hierdurch wurde eine Abgrenzung der Hauptpopulation von schwach CD34 positiven zu den wenigen, hochpositiven Zellen möglich. Die Region 2 wurde stets oberhalb der Hauptgruppe von schwach fluoreszierenden Zellen gewählt. Die Abbildung 12 stellt die Auswahl in einer solchen Probe dar.

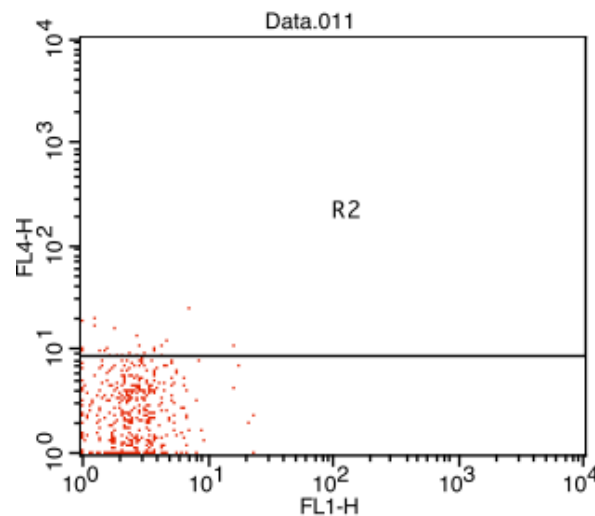


Abbildung 12: Region 2, ausgewählt aus dem FL1/FL4 Graphen bei Proben ohne CD45 Markierung. Die Anzahl der angezeigten Ereignisse ist zur besseren Diskriminierung stark vermindert.

Die oben beschriebenen Regionen wurden in Probereihen mit CD133 (A-Reihe) beziehungsweise CD110 (B-Reihe) gleichermaßen verwendet, da die entsprechenden Antigene in beiden Testungen markiert wurden waren.

Die Abbildung 13 zeigt die CD133 Markierung (A-Reihe) bei Proben mit und ohne CD45 im FL1/FL2 Graphen. In beiden Probegruppen können die stark CD133 positiven Zellen deutlich von den restlichen Zellen abgrenzt werden. Die stark CD133 positiven Zellen wurden als Region 3 ausgewählt.

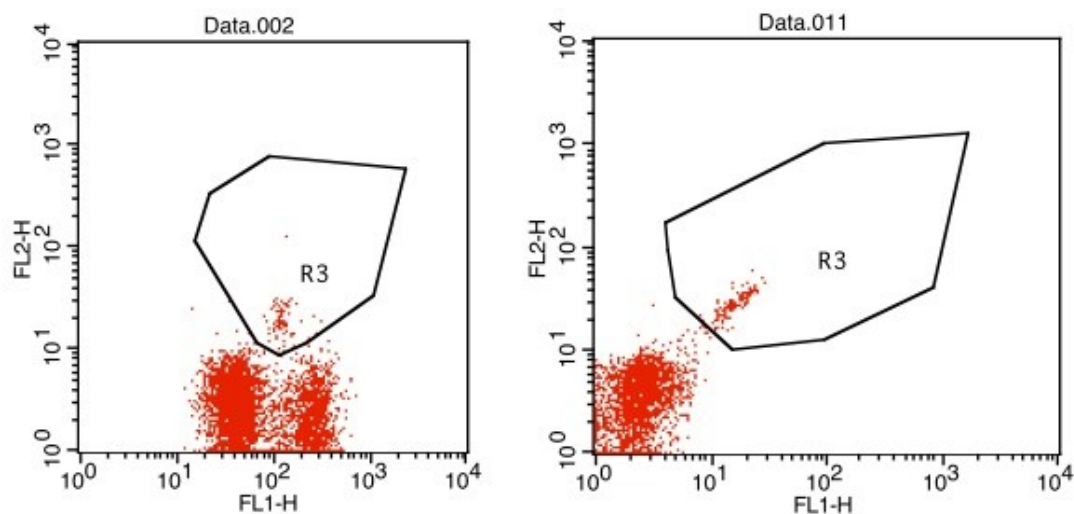


Abbildung 13: Auswahl der Region 3, CD133 positive Zellen, aus dem FL1/FL2 Graphen. Links (Data.002) ist eine Probe mit CD45 Markierung, rechts ohne CD45, dargestellt.

Der VEGF-R2 Antikörper wurde nur in Proben der CD133 Reihe genutzt. Dieses Antigen wurde in der Region 4 im FL1/FL3 Graphen selektiert. Gleichwohl unterschied sich die graphische Darstellung abhängig von der Verwendung des CD45 Antikörpers. Die entsprechenden hochpositiven Zellgruppen waren in beiden Fällen gut abgrenzbar. Da die Grafik prinzipiell der Abbildung 13 entspricht, wird auf eine Darstellung an dieser Stelle verzichtet.

Die Auswertung der CD110 Testreihe wurde in Abhängigkeit des Zusatzes von CD45 mit unterschiedlichen Masken durchgeführt. Während in Proben mit CD45 Markierung der FL1/FL2 Graph zur Anwendung kam. Wurde aufgrund einer besseren Darstellbarkeit ein FL2/SSC Graph bei Ansätzen ohne CD45 genutzt. In beiden Fällen wurden die CD110 positiven Zellen als Region 3 abgegrenzt. Für Proben mit CD45 konnten die stark Fluoreszenz markierten CD110 tragenden Zellen entlang zweier deutlicher Lücken zwischen den einzelnen Populationen im Diagramm selektioniert werden. Bei Proben ohne CD45 wurde abermals über eine Verringerung der visualisierten Punkte im Graphen eine Abgrenzung der wenigen hochpositiven, von der Hauptgruppe der schwach CD110 positiven Zellen, möglich. Die Auswahl ist exemplarisch in Abbildung 14 ersichtlich.

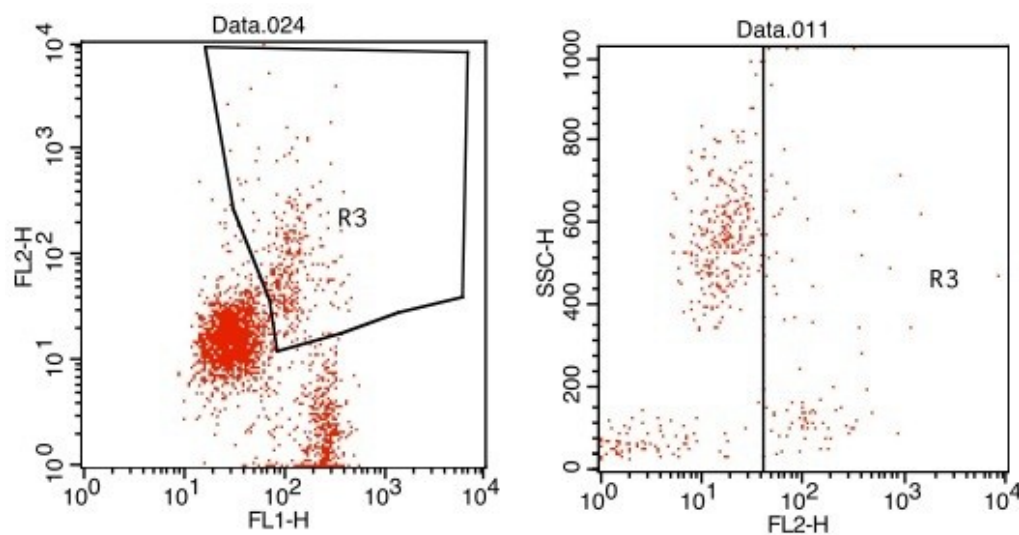


Abbildung 14: Abgrenzung der hochpositiven CD110 tragenden Zellen als Region 3. Links (Data.024) ist eine Probe mit CD45 Markierung und rechts eine ohne CD45 (Data.011) dargestellt. In der rechten Grafik ist die Anzahl visualisierter Ereignisse zur besseren Diskriminierung verringert worden.

Auch in der CD110 Testreihe wurde das zuvor beschriebene Gate 1 als Selektionsgrundlage verwendet. Neben dem CD110, für die Auswahl der megakaryozytären Linie, wurde der Stammzellmarker CD34 genutzt.

Im Anschluss an die vorher beschriebene Abgrenzung der einzelnen Zellpopulationen erfolgte die Analyse von Antigenkombinationen auf diesen Zellen. Durch die Verknüpfung einzelner Regionen über logische Gates ließ sich die Anzahl der Zellen ermitteln die mehrere der markierten Antigene gleichzeitig trugen. Logische Gates fungieren dabei wie mathematische Funktionen (siehe Abbildung 15). Nur wenn eine Zelle alle geforderten Kriterien erfüllt wird sie gewertet.

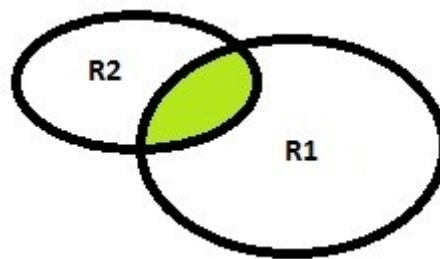


Abbildung 15: Veranschaulichung eines logischen Gates in der Theorie. Nur die grün gefärbten Zellen erfüllen beide Kriterien (R1 und R2) und werden gewertet.

Die mit dem Durchflusszytometer gewonnenen Daten entsprechen Absolutzahlen, das heißt es kann keine Aussage über die Zellkonzentration pro Volumeneinheit getroffen werden. Dies wird erst durch Korrelation der Messwerte mit dem gleichzeitig erhobenen Blutbild möglich. Bei der Aufarbeitung der Proben wurden die Blutleukozyten (WBC) von den Erythrozyten separiert. In der Untersuchung wurde die Population der Leukozyten in R1 abgegrenzt. Alle weiteren gewonnenen Messwerte beziehen sich auf R1. Somit kann über die Korrelation von R1 mit den WBC die Konzentration der Stammzellen im Blut beurteilt und interindividuell verglichen werden.

Beispielrechnung für CD34 positive Zellen, welche in R2 selektiert wurden:

$$\text{CD34(+)}/\mu\text{l} = (\text{R2}/\text{R1}) * \text{WBC}$$

$$\text{CD34(+)}/\mu\text{l} = (1000/50000) * 5000/\mu\text{l}$$

$$\text{CD34(+)}/\mu\text{l} = 100/\mu\text{l}$$

4.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung unserer Testreihen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Universität Jena, unter Verwendung der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics Version 19.

Initial erfolgte eine deskriptive Analyse der Studienpopulation. Hierbei wurde deutlich, dass ein erheblicher Anteil von Proben keine CD45 Markierung enthielt. Es stellte sich die Frage, ob entsprechende Proben dennoch gemeinsam ausgewertet werden dürfen oder die differierende Messmethode einen Einfluss auf unser Ergebnis hat.

Zur Beurteilung dieser Problematik wurden der Bland-Altman-Plot, sowie der Mann-Whitney-U Test und der Kolmogorov-Smirnov Test angewendet.

Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Messwerte, unter Beachtung der gewonnenen Erkenntnisse, mittels einer Multivarianzanalyse. Mittelwerte zweier Variablen, unabhängig von Einflussfaktoren, wurden mittels T-Test untersucht. Zur Feststellung einer linearen Korrelation wurde der Pearson Test genutzt.

Signifikante Ergebnisse entsprechen einem p-Wert kleiner 0,05.

5. Ergebnisse

Bevor mit der eigentlichen Auswertung der Studienergebnisse begonnen werden konnte, mussten methodisch bedingte Einflussfaktoren bewertet werden. Besonders die Auswirkung des teilweisen Nichtvorhandenseins der CD45 Markierung und der resultierenden Auswertung über eine zweite Analysemaske stand im Fokus.

5.1. Einfluss der CD45 Markierung

Im Testaufbau diente CD45 als Parameter zur einfacheren Selektion der Leukozyten im Blutpräparat. Durch die fehlende CD45 Markierung in einigen Probenansätzen, der Antikörper war bei mehreren Analyseprozeduren nicht verfügbar, musste eine zweite Analysemaske zur Auswahl der Leukozyten in der Region 1 erstellt werden.

Über das Verfahren nach Bland und Altman sollte die Vergleichbarkeit der beiden Analysemasken nachgewiesen werden (Grouven et al. 2007). Es stellte sich die Frage, ob beide Masken eine vergleichbare Anzahl an Zellen in der Region 1 auswählten. Für diese Fragestellung wurden die Rohdaten von 25 zufällig gewählten Studienproben mit CD45 Markierung verwendet. Die Datensätze wurden jeweils mit der Maske für Proben mit CD45 Markierung und ohne selbige ausgewertet. Wie in Abbildung 16 ersichtlich, liegen über 90% der Messwerte innerhalb der definierten Grenzen. Der gemessene R1-Wert unterscheidet sich im Mittel um 190 Zellen. In Anbetracht der durchschnittlich 50000 Zellen pro Probe ist dies ein zu vernachlässigender Wert. Aus dem Ergebnis des Bland Altman Plots lässt daher eine Vergleichbarkeit der beiden Messmethoden für die Region 1 schlussfolgern.

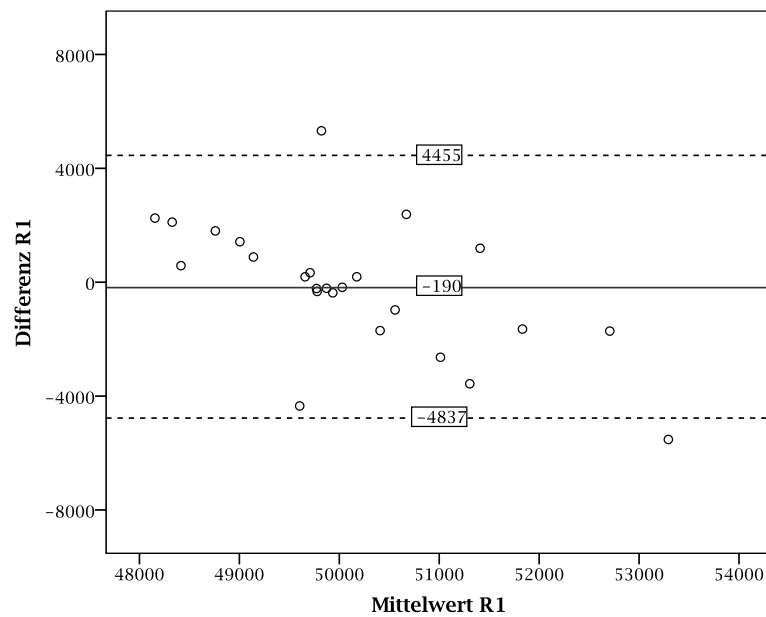


Abbildung 16: Bland-Altman-Plot. Mittelwerte der Messwerte für die Region 1 (R1) sind zu deren Differenzen aufgetragen. Die schwarze Linie stellt den Mittelwert aller Differenzen dar. Die gestrichelten Linien sind die limits of agreement (2-fache der Standardabweichung der Differenzen).

Ob diese Vergleichbarkeit auch für die Zielwerte der Untersuchung gegeben war, wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Testes und der Kolmogorov-Smirnov Testung eruiert.

Der Mann-Whitney-U Test prüft zwei Variablen auf ihre Homogenität, diese wird durch einen p-Wert größer 0,05 bestätigt.

Es zeigte sich, dass die Ausgangsvariable CD34 (Region 2), in A- und B-Reihe, unabhängig von der Messmethode war ($p=0,187$ bzw. $p=0,522$). CD133 (Region 3) und VEGF-R2 (Region 4) hingegen unterschieden sich ($p=0,000$) in der A-Reihe, je nachdem ob die Probe mit CD45 Markierung oder ohne selbige ausgewertet wurde. CD110 (Region 3), welches in der B-Reihe untersucht wurde, zeigte eine Tendenz zur Inhomogenität zwischen beiden Methoden ($p=0,079$). Die Messwerte für Zellen mit der Antigenkombination aus CD34 und CD110 bestätigten diese Trend ($p=0,000$).

Der Kolmogorov-Smirnov Test untersucht zwei Variablen auf ihre gleichsame Verteilung, welche durch einen p-Wert größer 0,05 bestätigt wird. Hier zeigten sich vergleichbare Ergebnisse für die zuvor angesprochenen Variablen. Tabelle 3 fasst die Testergebnisse zusammen.

	A: CD34	A: CD133	A: VEGF-R2	B: CD34	B: CD110	B: CD34 + CD110
Mann-Whitney-U	p=0,187	p=0,000	p=0,000	p=0,522	p=0,079	p=0,000
Kolmogorov-Smirnov	p=0,213	p=0,000	p=0,000	p=0,160	p=0,155	p=0,000

Tabelle 3: Untersuchung des Einflusses der CD45 Markierung auf die Messergebnisse. Angegeben sind die Signifikanzwerte des Mann-Whitney-U Tests und Kolmogorov-Smirnov Tests. Lediglich die Werte für CD34 und CD110 sind unabhängig von der Messmethode.

Unter Verwendung der oben genannten Tests wurden die über logische Gates erzielten Messwerte der Antigenkombinationen untersucht. In der A-Reihe waren alle Kombinationen, bis auf die Zusammensetzung CD133 mit VEGF-R2, homogen und gleichsam verteilt (Tabelle 4).

	A: CD34 + VEGF-R2	A: CD34 + CD133	A: CD133 + VEGF-R2	A: CD34 + CD133 + VEGF-R2
Mann-Whitney-U	p=0,764	p=0,270	p=0,001	p=0,372
Kolmogorov-Smirnov	p=0,905	p=0,349	p=0,001	p=0,693

Tabelle 4: Einfluss der CD45 Markierung auf die Messergebnisse. Dargestellt sind Signifikanzwerte der statistischen Testverfahren für Antigenkombinationen der A-Reihe. Lediglich bei der Kombination CD133 mit VEGF-R2 wird die Vergleichbarkeitshypothese abgelehnt.

Aus den Ergebnissen des Mann-Whitney-U sowie des Kolmogorov-Smirnov Tests wurde geschlussfolgert, dass die Verwendung der CD45 Markierung einen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studie ausübt.

5.2. Einfluss von R1

Um dem Ursprung der Differenz abhängig vom CD45 Status weiter nachzugehen wurde die Variable R1 genauer analysiert. R1 galt als Grundlage der Auswertung und wurde je nach Maske unterschiedlich erhoben.

Im Folgenden werden nur die Erkenntnisse aus der Testreihe A angeführt. Die Ergebnisse gleichen denen der B-Reihe, weshalb auf deren Darstellung verzichtet wird

Es stellte sich heraus, dass sich die Mittelwerte für R1 abhängig vom Spenderstatus unterschieden (Tabelle 5).

	R1: Mittelwert	R1: Median
Langezeitspender	51209	49469
Erstspender	49256	49252

Tabelle 5: Mittelwerte für R1 der A-Reihe bezogen auf die gesamte Studienpopulation.

R1, als Grundlage der Untersuchung sollte unabhängig von Spender Status und CD45 Markierung sein. Mittels Mann-Whitney-U Test konnte eine Inhomogenität von R1, abhängig von der Gruppeneinteilung und CD45 Status, nachgewiesen werden. Der Kolmogorov-Smirnov Test zeigte eine ungleiche Verteilung im Bezug auf die CD45 Markierung, aber nicht auf die Gruppeneinteilung (Tabelle 6).

Abhängigkeit von R1 von:	Mann-Whitney-U	Kolmogorov-Smirnov
Gruppe (n=128)	p=0,026	p=0,115
CD45 (n=128)	p=0,003	p=0,017

Tabelle 6: Abhängigkeit vom R1-Wert von der Gruppeneinteilung bzw. der CD45 Markierung. Die Daten bezogen auf die Gesamtstudienpopulation.

Bei der grafischen Aufarbeitung unter Hinzunahme des CD45 Status zeigte sich, dass besonders die nicht CD45 markierten Proben einige Extremwerte für R1 aufwiesen (Abbildung 17).

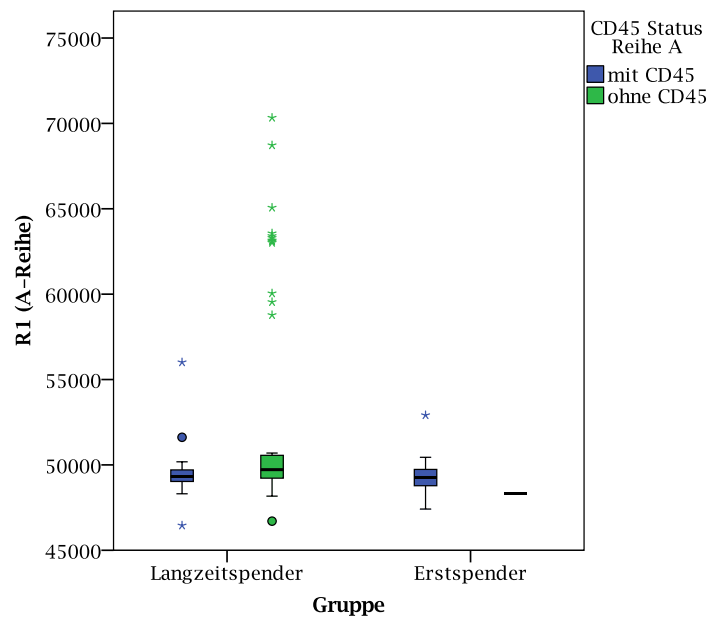


Abbildung 17: Boxplot für R1 der A-Reihe bezogen auf die gesamte Studienpopulation unter Betrachtung des CD45 Status.

Retrospektiv betrachtet sind diese Extremwerte durch eine unzureichend konfigurierte FACS Analysemaske während der ersten Messungen zu erklären. Dies gilt einerseits für den ersten Messwert der mit CD45 markierten Proben ($R1 = 56000$), sowie die ersten 12 Werte der Proben ohne CD45 Markierung ($R1: 58775$ bis 70332 ; Mittelwert: 64612).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden Proben mit einem $R1$ -Wert größer 55000 aus der Analyse ausgeschlossen. Unter dieser Einschränkung glichen sich die Mittelwerte der Spendergruppen für $R1$ an (Tabelle 7).

	R1: Mittelwert	R1: Median
Langezeitspender	49352	49365
Erstspender	49256	49252

Tabelle 7: Mittelwerte für R1 der A-Reihe bezogen auf die gesamte Studienpopulation, ohne Proben mit einem $R1$ -Messwert größer 55000 .

Folgerichtig zeigten auch die angefertigten Boxplot Diagramme eine Annäherung der Mittelwerte (Abbildung 18).

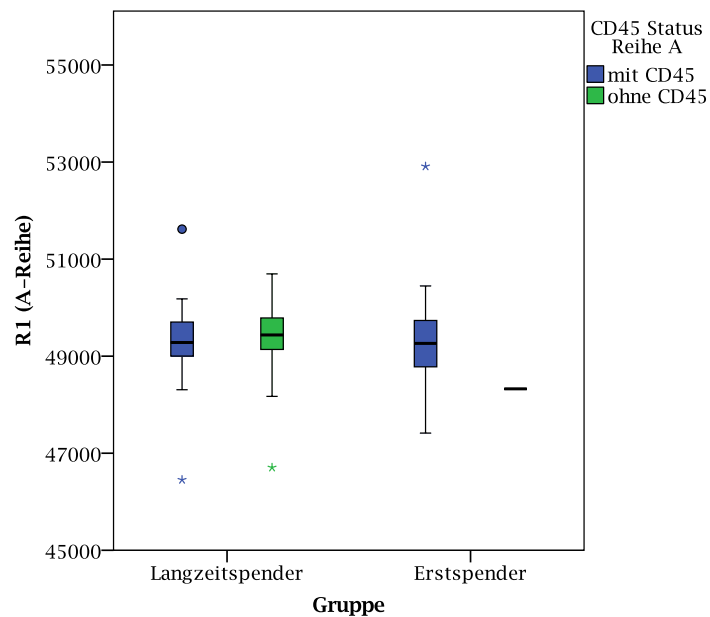


Abbildung 18: Boxplot für R1 der A-Reihe mit Betrachtung des CD45 Status. Die Daten beziehen sich auf die gesamte Studienpopulation unter Ausschluss von Proben mit R1-Werten größer 55000.

Der erneut durchgeführte Mann-Whitney-U Test zeigte keine Inhomogenität bei den R1-Werten abhängig von Gruppeneinteilung oder CD45 Status auf. Auch der Kolmogorov-Smirnov Test konnte keine ungleichsame Verteilung der R1-Werte mehr nachweisen (Tabelle 8).

Abhängigkeit von R1 von:	Mann-Whitney-U	Kolmogorov-Smirnov
Gruppe (n=115)	p=0,237	p=0,262
CD45 (n=115)	p=0,270	p=0,426

Tabelle 8: Testung von R1 (A-Reihe), unter Ausschluss von $R1 > 55000$. Mann-Whitney-U und Kolmogorov-Smirnov Test nehmen Bezug auf Gruppeneinteilung und CD45 Status. Angegeben sind die Signifikanzwerte der Tests.

5.3. Studienpopulation

Nach erfolgter Vorbetrachtung und Beachtung der gewonnenen Erkenntnisse konnte die Studienpopulation endgültig beschrieben werden. Von den anfänglich 183 Probanden mussten aufgrund methodischer Fehler je nach Testreihe 16 Probanden (A-Reihe) respektive 36 (B-Reihe) ausgeschlossen werden. Als methodischer Fehler galten das Nichtvorhandensein einer

Probe oder ein Messwert für R1 größer 55000. Von den verbliebenen 167 der A-Reihe entfielen weitere 52 Probanden da diese nicht den Studienkriterien (siehe 4.2) entsprachen. In der B-Reihe betraf dies von den 147 verbliebenen Proben 43. Am Ende konnten 115 Probanden der A-Reihe ausgewertet werden. Davon zählten 82 zur Gruppe der Langzeitspender, 33 waren Erstspender. In der B-Reihe waren es mit 73 Langzeitspendern und 31 Erstspendern insgesamt 104 Probanden (Abbildung 19), die in die Auswertung eingingen.

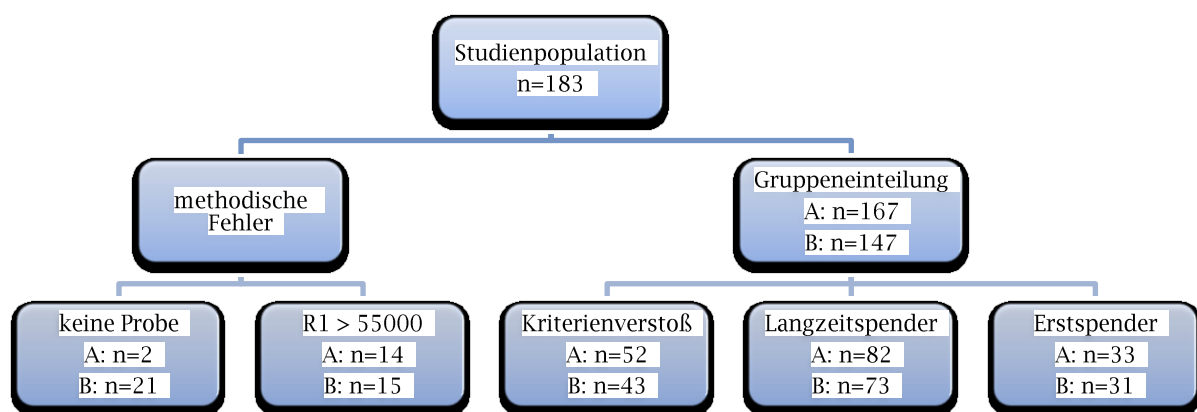


Abbildung 19: Studienpopulation und Gruppeneinteilung. A steht für die Analyse der endothelialen Stammzellen, B für die thrombopoetische Testreihe.

Zur genaueren Charakterisierung der Gruppen wurden neben Alter und Geschlecht die Mittelwerte der Blutwerte bei Studieneintritt bestimmt. (Tabelle 9). Auffällig hierbei ist die ungleiche Geschlechterverteilung innerhalb der Gruppe der Langzeitspender. Unabhängig von der Testreihe waren circa 85% dieser Spendergruppe Männer und weniger als 15% Frauen. Für Erstspender hingegen war das Verhältnis zwischen Männern und Frauen nahezu ausgeglichen. Bei Betrachtung des Alters zum Zeitpunkt der Spende zeigte sich erwartungsgemäß ein höheres Durchschnittsalter der Langzeitspender. Im Mittel waren sie knapp 9 Jahre älter als ein Erstspender. Bei einem Blick auf die Blutwerte zeigte sich ein recht ausgeglichenes Bild. Im Mittel lagen alle Parameter im Referenzbereich (Hagemann 2010).

		A-Reihe		B-Reihe	
		LS	ES	LS	ES
Anzahl		82	33	73	31
Geschlecht	männlich [n]	70 (85,4%)	18 (54,5%)	64 (87,7%)	17 (54,8%)
	weiblich [n]	12 (14,6%)	15 (45,5%)	9 (12,3%)	14 (45,2%)
Alter in Jahren (Mittelwert)		37,2	29,3	38,1	28,1
Blutbild (Mittelwert)	WBC [$10^3/\mu\text{l}$]	5,4	6,6	5,4	6,6
	PLT [$10^3/\mu\text{l}$]	248	222	247	224
	Hb [g/dl]	14,6	13,9	14,6	13,9
	RBC [$10^6/\mu\text{l}$]	4,8	4,7	4,8	4,7
	MCV [fl]	87,2	91,6	87,2	91,4
	MCH [pg]	30,3	29,9	30,4	29,8
	MCHC [g/dl]	34,7	32,6	34,8	32,6

Tabelle 9: Charakterisierung der Spendergruppen. Angegeben sind die Anzahl der Probanden mit Geschlechterverteilung und die Mittelwerte für Alter und Blutbildparameter.

Unterschiede bestanden in einer leicht höheren Plättchenzahl (PLT) und niedrigeren Leukozytenzahl (WBC) bei Langzeit Spendern im Vergleich zur Gruppe der Erstspender. Auch unter Berücksichtigung des Ungleichgewichts in der Geschlechterverteilung zwischen beiden Spendergruppen blieben diese Unterschiede bestehen (Tabelle 10).

Probanden	Zelltyp	A-Reihe		B-Reihe	
		LS	ES	LS	ES
Männlich	WBC [$10^3/\mu\text{l}$]	5,3	6,5	5,3	6,4
	PLT [$10^3/\mu\text{l}$]	243	211	243	208
Weiblich	WBC [$10^3/\mu\text{l}$]	6,1	6,8	6,3	6,9
	PLT [$10^3/\mu\text{l}$]	275	235	271	242

Tabelle 10: Mittelwerte der Thrombozyten und Leukozyten aufgetrennt nach Geschlecht und Spendergruppe.

Wie bereits im Abschnitt „5.1 Einfluss der CD45 Markierung“ erwähnt war ein Einfluss der verwandten Messmethodik, je nach CD45 Markierung, auf die Ergebnisse festzustellen. Aus diesem Grund wurde die Analysegruppe noch einmal nach ihrem CD45 Status unterteilt. Wie

in Tabelle 11 ersichtlich ist die Verteilung der Proben nach CD45 Status uneinheitlich. Da die Erstspender von dieser Problematik fast unberührt blieben ist eine separate statistische Signifikanzprüfung für Proben ohne CD45 Markierung nicht möglich. Um diese Proben dennoch in die Auswertung einschließen zu können, wurden die Gruppen der Langzeit- und Erstspender einmal unter Ausschluss der nicht CD45 markierten Proben und ein weiteres Mal unter deren Integration untersucht. Im Anschluss erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse.

Testreihe	Gruppe	Mit CD45	Ohne CD45
A-Reihe	Langzeitspender (n=82)	42	40
	Erstspender (n=33)	32	1
B-Reihe	Langzeitspender (n=73)	35	38
	Erstspender (n=31)	30	1

Tabelle 11: Dargestellt ist die Anzahl der Proben mit bzw. ohne CD45 Markierung aufgeschlüsselt nach Gruppe und Testreihe.

In Tabelle 12 ist die durchschnittliche Anzahl der Blutspenden über den Beobachtungszeitraum 1994 bis zum Studieneintritt 2009 dargestellt. Hierbei wurden die Daten nach CD45 Status, Thrombozytenkonzentrat-Spenden (TK_ges) und Spenden insgesamt, ohne Unterscheidung des gespendeten Blutproduktes, aufgetrennt. Letzteres wurde als Spenden gesamt (S_ges) bezeichnet und beinhaltet die Anzahl aller Vollblut-, TK-, sowie Blutplasmaspenden.

Testreihe	Blutprodukt	Mit CD45	Ohne CD45	Gesamt
A-Reihe	TK_ges (MW)	72,21	83,17	77,56
	S_ges (MW)	81,69	96,60	88,96
B-Reihe	TK_ges (MW)	81,54	85,87	83,79
	S_ges (MW)	90,80	100,13	95,66

Tabelle 12: Aufgelistet ist die Gesamtzahl der Blutspenden (S_ges) und die Anzahl der Thrombozytenspenden (TK_ges) bei Langzeit Spendern (Mittelwert) unabhängig (Gesamt) und abhängig vom CD45 Status.

5.4. Kofaktoren

Unter Betrachtung des unterschiedlichen mittleren Alters und des Ungleichgewichts der Geschlechterverteilung zwischen den Spendergruppen, wurde der Einfluss dieser Parameter auf die Stammzellpopulationen untersucht. Für die Auswertung kam eine Multivarianzanalyse zur Anwendung.

Es zeigte sich, dass das Geschlecht keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellen hatte (Tabelle 13).

Kofaktor: Geschlecht	A-Reihe: ohne CD45(-)	A-Reihe: mit CD45(-)	B-Reihe: ohne CD45(-)	B-Reihe: mit CD45(-)
Signifikanz (p-Werte Min-Max)	0,253-0,515	0,159-0,392	0,437-0,874	0,241-0,989

Tabelle 13: Multivarianzanalyse für den Kofaktor Geschlecht. Angegeben ist die Streuung der Signifikanzwerte über eine Testreihe. Jede Reihe wurde dabei einmal unter Ausschluss bzw. Einschluss nicht CD45 markierter Proben separat ausgewertet. Unabhängig von der Antigenkombination war kein Einfluss durch das Geschlecht nachweisbar.

Für weitere Analysen schlossen wir den Kofaktor Geschlecht aus unserer Betrachtung aus.

Der Einfluss des Kofaktors Alter konnte anhand der Multivarianzanalyse weder vollständig bewiesen noch ausgeschlossen werden. Proben der A-Reihe, unter CD45(-) Ausschluss, wiesen einen tendenziellen bis signifikanten Einfluss auf. Durch Hinzunahme der nicht CD45 markierten Proben wandelte sich dieses Bild vollständig (Tabelle 14).

Kofaktor: Alter (A- Reihe)	CD34	CD133	VEGFR2	CD 34 CD 133	CD34 VEGFR2	CD133 VEGFR2	CD34 CD133 VEGFR2
p-Wert Ohne CD45(-)	0,029	0,061	0,069	0,135	0,075	0,055	0,118
p-Wert Mit CD45(-)	0,408	0,114	0,127	0,465	0,237	0,116	0,469

Tabelle 14: Multivarianzanalyse des Kofaktors Alter. Angegeben sind die Signifikanzwerte für den Einfluss des Spenderalters auf die Messwerte der untersuchten Antigene. Ausgewertet wurde die A-Reihe unter Beachtung des CD45 Status.

In der B-Reihe konnte ein Einfluss durch das Spenderalter, unabhängig vom CD45 Status, zumindest für CD34 positive Zellen vermutet werden (Tabelle 15).

Kofaktor: Alter (B-Reihe)	CD34	CD110	CD34 CD110
p-Wert ohne CD45(-)	0,058	0,997	0,123
p-Wert mit CD45(-)	0,040	0,312	0,059

Tabelle 15: Dargestellt sind die Signifikanzwerte der Multivarianzanalyse für den Einfluss des Kofaktors Spenderalter auf die Messwerte der B-Reihe.

Aufgrund des uneinheitlichen Bildes für den Kofaktor Spenderalter wurde dieser in die eigentliche Auswertung mit einbezogen.

Als weiteren Kofaktor wurde die Leukozytenzahl im Blutbild gewählt. Sie diente als Bezugsgröße zur Berechnung der Stammzellzahl pro Volumeneinheit und war in der Studienkohorte einer gewissen Schwankungsbreite unterworfen. Die Multivarianzanalyse bestätigte den Einfluss unabhängig von der Antigenkonstellation.

5.5. Datenauswertung

Im Rahmen der Datenauswertung wurden alle Antigenkombinationen der A-Reihe und B-Reihe betrachtet. Hierbei kam die Multivarianzanalyse zur Anwendung. Als feste Prüfvariable galt die Gruppeneinteilung. Die Mittelwerte wurden für das Alter des Spenders und Leukozytenzahl im Blutbild standardisiert. Aufgrund der zuvor erwähnten CD45 Problematik wurden die Daten einmal ohne nicht CD45 markierte (CD45(-)) Proben und ein weiteres Mal unter deren Integration ausgewertet.

Für Proben der A-Reihe wurden alle Analysen ohne CD45(-) Proben auf ein Spenderalter von 32,4 Jahren und einen WBC von $5,935 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ standardisiert. Bei Integration der CD45(-) wurde ein Standardalter von 34,9 Jahren und ein WBC-Wert von $5,757 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ angenommen. Für die Antigenkombination CD34 mit CD110 (B-Reihe) ohne CD45(-) war das Standardalter

32,3 Jahre, die standardisierte Leukozytenkonzentration betrug $5,894 \cdot 10^3/\mu\text{l}$. Unter Hinzunahme der CD45(-) Proben galt ein Alter von 35,1 Jahren und eine WBC-Wert von $5,769 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ als Standard.

In den folgenden Tabellen sind die Mittelwerte und der 95% Konfidenzintervall der untersuchten Antigenkombinationen angegeben. Der Einfluss der Gruppenvariable auf den Mittelwert wird durch den p-Wert angegeben. Ein p-Wert kleiner 0,05 zeigt eine signifikante Auswirkung auf den berechneten Mittelwert an. Antigenkombinationen aus CD34, CD133 und VEGF-R2 wurden in der Testreihe A (Tabelle 16 bis Tabelle 19) bestimmt.

CD34 VEGF-R2			95% Konfidenzintervall		
		MW [$10^1/\mu\text{l}$]	Min	Max	p-Wert
Ohne CD45(-)	LS (n=42)	31,00	23,82	38,18	0,003
	ES (n=32)	12,81	4,45	21,17	
Mit CD45(-)	LS (n=82)	28,25	23,95	32,56	0,001
	ES (n=33)	13,46	6,33	20,59	

Tabelle 16: A-Reihe: Mittelwerte (MW) der CD34 und VEGF-R2 positiven Zellen.

CD34 CD133			95% Konfidenzintervall		
		MW [$10^1/\mu\text{l}$]	Min	Max	p-Wert
Ohne CD45(-)	LS (n=42)	36,70	29,22	44,18	0,000
	ES (n=32)	14,49	5,78	23,19	
Mit CD45(-)	LS (n=82)	32,08	27,56	36,60	0,000
	ES (n=33)	15,11	7,62	22,60	

Tabelle 17: A-Reihe: Mittelwerte (MW) der CD34 und CD133 positiven Zellen.

CD133 VEGF-R2			95% Konfidenzintervall		
		MW [$10^1/\mu\text{l}$]	Min	Max	p-Wert
Ohne CD45(-)	LS (n=42)	214,67	164,84	264,50	0,008
	ES (n=32)	103,63	45,62	161,64	
Mit CD45(-)	LS (n=82)	161,70	130,65	192,71	0,063
	ES (n=33)	102,17	50,78	153,54	

Tabelle 18: A-Reihe: Mittelwerte (MW) der CD133 und VEGF-R2 positiven Zellen.

CD34 CD133 VEGF-R2			95% Konfidenzintervall		
		MW [$10^1/\mu\text{l}$]	Min	Max	p-Wert
Ohne CD45(-)	LS (n=42)	28,24	21,17	35,31	0,003
	ES (n=32)	10,47	2,24	18,70	
Mit CD45(-)	LS (n=82)	26,01	21,86	30,33	0,001
	ES (n=33)	11,25	4,23	18,27	

Tabelle 19: A-Reihe: Mittelwerte (MW) der CD34, CD133 und VEGF-R2 positiven Zellen.

Die B-Reihe diente der Analyse der Antigenkonstellation CD34 mit CD110 (Tabelle 20).

CD34 CD110			95% Konfidenzintervall		
		MW [$10^1/\mu\text{l}$]	Min	Max	p-Wert
Ohne CD45(-)	LS (n=35)	136,72	124,60	148,84	0,017
	ES (n=30)	113,10	99,85	126,34	
Mit CD45(-)	LS (n=73)	115,95	107,42	124,48	0,500
	ES (n=31)	110,01	96,22	123,95	

Tabelle 20: B-Reihe: Mittelwerte (MW) der CD34 und CD110 positiven Zellen.

5.6. Auswirkung der CD45 Integration

Die Auswirkung der Integration von nicht CD45 markierten Proben auf die Analyseergebnisse wird in den Abbildung 20 und Abbildung 21 veranschaulicht. Es zeigt sich, unabhängig von der Antigenkombination, nach Eingliederung der CD45(-) Proben stets eine Annäherung der Mittelwerte. Wobei die Zellzahlen der Langzeitspender konstant höher sind als die der Erstspender.

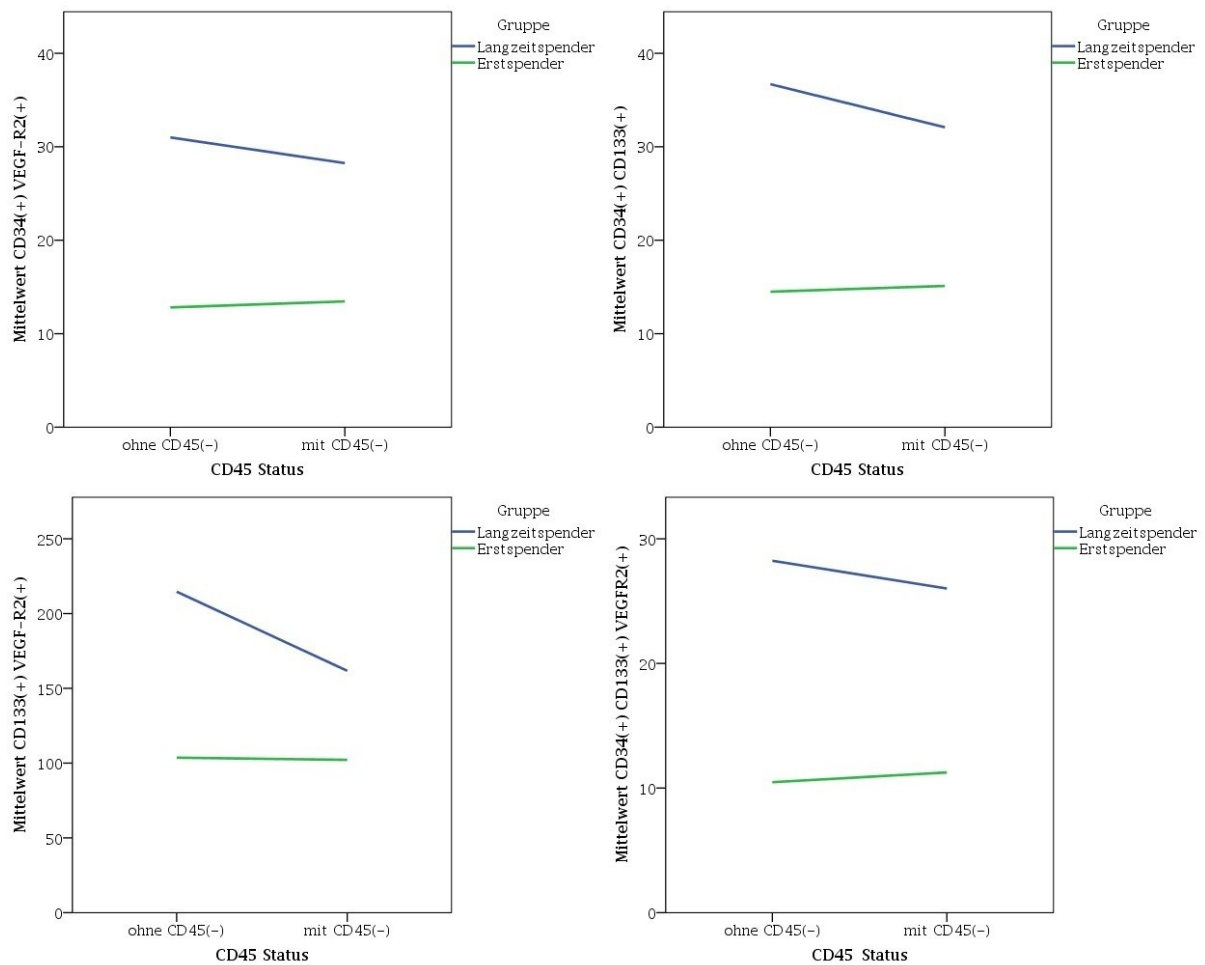


Abbildung 20: Veränderung der Mittelwerte der getesteten Antigenkombinationen nach Integration der nicht CD45 markierten Proben in die Auswertung. „Ohne CD45 (-)“ entspricht der Gruppe unter Ausschluß dieser Proben, „mit CD45 (-)“ steht für deren Einschluss. Die Werte sind in Zellen pro Mikroliter angegeben.

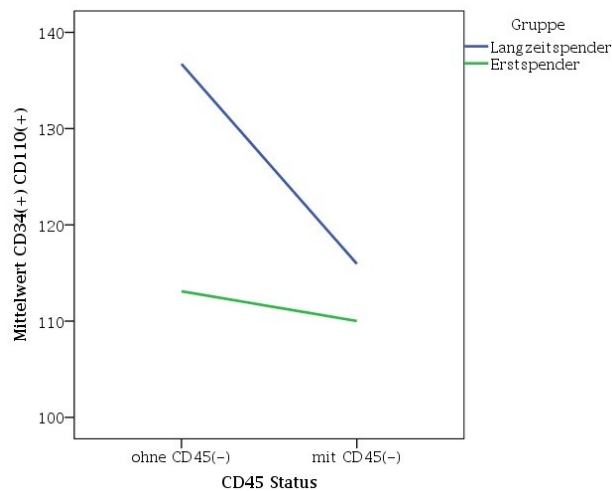


Abbildung 21: Dargestellt ist der Einfluss der CD45 Markierung auf die Mittelwerte der CD34 und CD110 positiven Proben der B-Reihe (Vergleichbar zu Abbildung 20).

5.7. Langzeitspender: Auswirkung der Gesamtspendenanzahl

Hat die kumulativ gespendete Menge an Thrombozytenkonzentraten einen Einfluss auf die Anzahl an Stammzellen?

Unter Einschluss der Kofaktoren Alter und WBC wurden die Stammzellkonzentration mittels einer Multivarianzanalyse auf diese Frage hin überprüft. Die kumulative Anzahl der Spenden wurde einmal unabhängig vom gespendeten Blutprodukt als Gesamtanzahl von Spenden (S_{ges}) ausgewertet. Im nächsten Schritt wurde die Art der Spende auf die Thrombozytenapherese eingeschränkt. Diese wurde nach Anzahl der Spenden (TK_{ges}) und nach dem gespendeten Volumen (TK_{ml}) unterteilt, da Thrombozytenspenden als Einfach- (250ml) und Doppelspenden (500ml) durchgeführt werden können. Der Beobachtungszeitraum bezog sich auf die Jahre 1994 bis zur Studienteilnahme 2009.

Es zeigte sich in keinem untersuchten Szenario ein signifikanter Einfluss der Kumulationsvariablen. In der A-Reihe ließ sich höchstens ein Trend für rein CD34 positive Zellen vermuten. Jedoch konnte diese Tendenz anhand der B-Reihe Proben nicht nachvollzogen werden (Tabelle 21).

CD34(+)	A: Ø CD45(-)	A: + CD45(-)	B: Ø CD45(-)	B: + CD45(-)
TK_ges	p=0,094	p=0,056	p=0,225	p=0,352
TK_ml	p=0,087	p=0,079	p=0,348	p=0,644
S_ges	p=0,156	p=0,139	p=0,259	p=0,409

Tabelle 21: Auswirkung der kumulativen Spendenanzahl auf das Niveau CD34 positiver Zellen. Angegeben sind die p-Werte. Ø CD45(-) entspricht der Auswertung ohne CD45(-) Proben, + CD45(-) steht für deren Integration.

In der B-Reihe war die Kombination aus CD34 und CD110 auffällig. Obgleich diese Vermutung nur durch Tendenzen begründet war, welche sich unter Hinzunahme der nicht CD45 markierten Proben aber weiter abschwächte (Tabelle 22).

CD34(+) CD110(+)	B: Ø CD45(-)	B: + CD45(-)
TK_ges	p=0,067	p=0,113
TK_ml	p=0,104	p=0,272
S_ges	p=0,065	p=0,098

Tabelle 22: Auswirkung der kumulativen Spendenanzahl auf CD34 CD110 positive Zellen (Variablenerklärung siehe Tabelle 21).

5.8. Subgruppenanalyse Langzeitthrombozytenspender

Von den 85 Langzeit Spendern konnte für 51 (42 Männer und 9 Frauen) das Blutbild zu Beginn der Karriere als Thrombozytenspender aus der Datenbank des Instituts für Transfusionsmedizin ermittelt werden (Tabelle 23).

Geschlecht [n]	Alter [Jahre]	Spendedauer [Jahre]	TK_ges [n] (min - max)	TK_ml [l] (min - max)	S_ges [n] (min - max)
42 ♂; 9 ♀	35,2	3,3 (0,7 – 10,1)	48,8 (10 – 163)	20,4 (2,5 – 69,25)	59,3 (14 – 173)

Tabelle 23: Charakterisierung der Untergruppe von 51 Langzeitthrombozytenspendern. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) sowie in Klammern die Minimal- bzw. Maximalwerte der kumulativen Spendenvariablen. Weiterhin sind die Geschlechterverteilung, das Durchschnittsalter und die mittlere TK Spendendauer mit Minimum und Maximum angegeben.

Es zeigten sich signifikante Veränderungen im Blutbild der Langzeitthrombozytenspender. So verringerte sich die Thrombozytenkonzentration um $7,3 \times 10^3/\mu\text{l}$, wobei dies innerhalb der Gruppe zwischen $-99,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ und $+65,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ variierte. Auch die Zahl der Leukozyten nahm im Verlauf der Plättchenspende um $0,58 \times 10^3/\mu\text{l}$ ab. Der zu Studieneintritt gemessene Hb war 0,15 g/dl niedriger als der Initialwert (Tabelle 24).

	PLT [$10^3/\mu\text{l}$]	WBC [$10^3/\mu\text{l}$]	Hb [g/dl]
Beginn (MW)	249,3	6,12	14,63
Studie (MW)	241,9	5,54	14,48
Diff (MW)	-7,3	-0,58	-0,15
Diff (Min-Max)	-99,0 – +65,0	-3,60 – +2,10	-1,70 – +2,10
T-test (p-Wert)	0,000	0,000	0,000

Tabelle 24: Angegeben sind die Mittelwerte (MW) und die Minimal- bzw. Maximalwerte der Blutwerte vor der ersten TK-Spende (Beginn) und bei Studieneintritt (Studie) sowie deren Differenz (Diff). Der T-Test weist die statistisch signifikante Veränderung für alle drei Werte nach ($p=0,000$).

Mit Hilfe des linearen Korrelationstest nach Pearson wurde die Korrelation zwischen den kumulativen Spendenvariablen und der Blutbildveränderung unter dem Einfluss der Thrombozytenspende untersucht. Es zeigte sich, dass die gemessenen Veränderungen der Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration mit keiner der Kumulationsvariablen korrelierte. Nur für die Verringerung des Hämoglobinwertes zeigte sich ein schwacher, aber signifikanter Zusammenhang mit der Anzahl gespendeter Thrombozytenkonzentrate ($p=0,013$) sowie dem TK-Gesamtvolumen ($p=0,046$). Für die Korrelation mit der Gesamtzahl an Blutspenden, unabhängig vom Blutprodukt verfehlte die Veränderung der Hämoglobinkonzentration das Signifikanzniveau von 0,05 knapp. Ein deutlicher Zusammenhang war für die Veränderung der Blutwerte im Vergleich zu deren Initialwert vor der ersten TK-Spende ersichtlich (Tabelle 25).

	PLT Diff		WBC Diff		Hb Diff	
	Pearson	p-Wert	Pearson	p-Wert	Pearson	p-Wert
TK_ges	-0,019	0,895	-0,149	0,297	-0,345	0,013
TK_ml	0,000	0,999	-0,057	0,691	-0,281	0,046
S_ges	0,068	0,637	-0,137	0,339	-0,269	0,056
Initialwert	-0,302	0,031	-0,370	0,008	-0,494	0,000

Tabelle 25: Korrelation der Blutbildveränderungen (Diff) mit den kumulativen Spendenvariablen und initialen Blutwert. Der Pearson Test zeigt die Stärke des linearen Zusammenhangs an und prüft auf Signifikanz (p-Wert). Die Blutbildveränderung (PLT, WBC, Hb) ist abhängig vom Ausgangswert. Eine Korrelation zu den Kumulationsvariablen besteht nur für die Hb Veränderung.

In den folgenden Abbildungen wird die Verteilung der Zellzahlveränderung nach dem initialen Blutwert verdeutlicht. In Bezug auf die Thrombozyten und Leukozyten wiesen Probanden mit einem hohen Ausgangswert die größten Veränderungen auf (Abbildung 22 und Abbildung 23).

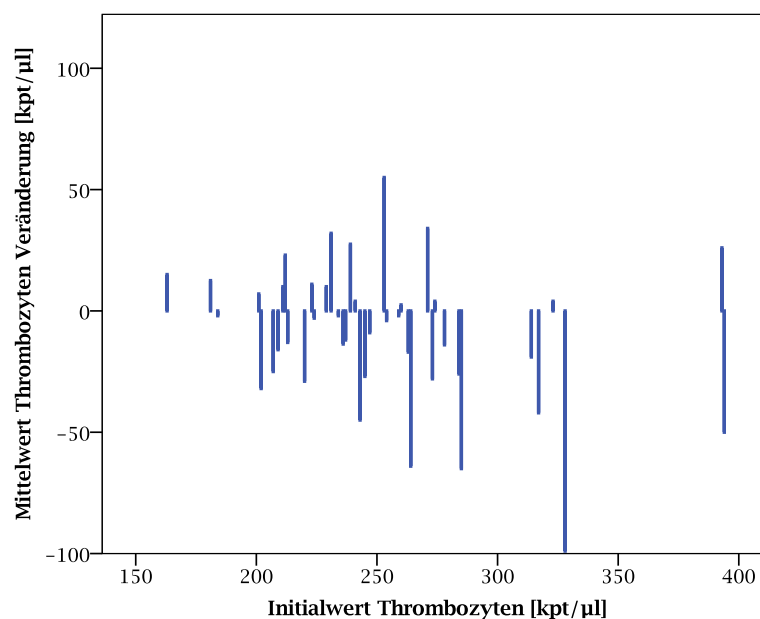


Abbildung 22: Veränderung der Thrombozytenkonzentration in Abhängigkeit zum initialen Thrombozytenwert.

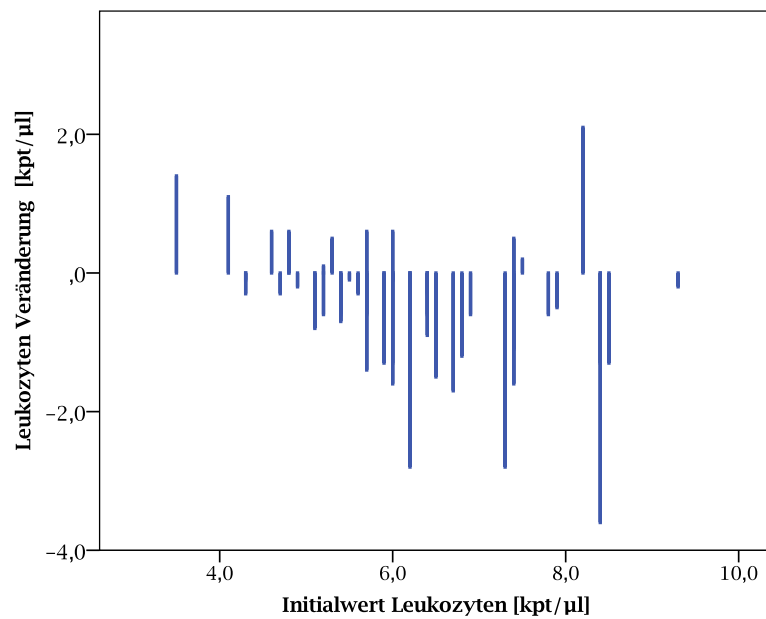


Abbildung 23: Veränderung der Leukozytenkonzentration in Abhängigkeit zum Ausgangswert.

Die Schwankungsbreite der Veränderung des Hämoglobinwertes hingegen war unabhängig vom Ausgangswert. Jedoch gingen auch hier hohe Ausgangswerte mit einer Senkung einher, während niedrigere Initialwerte zu einer Erhöhung der Hämoglobinkonzentration führten (Abbildung 24).

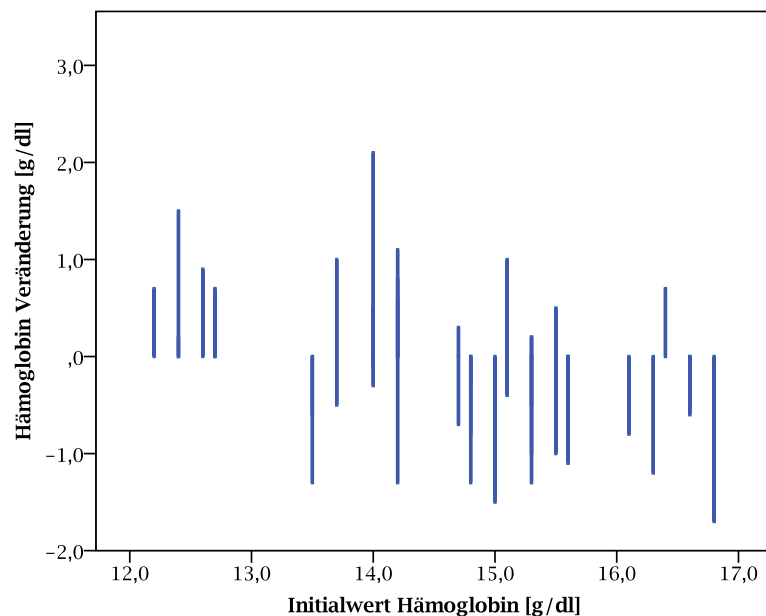


Abbildung 24: Veränderung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit zum Initialwert.

Einen Einfluss von Alter oder Geschlecht der Probanden auf die Blutbildveränderungen konnte nicht festgestellt werden. Auch die Länge des Zeitraums zwischen erster TK Spende und Studienbeginn war unerheblich (Tabelle 26).

	PLT Diff	WBC Diff	Hb Diff
Alter (p-Wert)	0,645	0,519	0,971
Geschlecht (p-Wert)	0,456	0,499	0,473
TK Spendedauer (p-Wert)	0,723	0,957	0,141

Tabelle 26: ANOVA Test zum Einfluss von Alter, Geschlecht, Spendedauer auf die Blutbildveränderungen. Es ist kein signifikanter Einfluss nachweisbar. Angegeben sind die p-Werte.

6. Diskussion

6.1. Thrombozytäre Stammzellen

1988 limitierte die US amerikanische Food and Drug Administration (FDA) die Thrombozytenapheresespende auf 24 Prozeduren pro Jahr. Grund hierfür waren alarmierende Daten damals vorliegender Studien, die bei chronischen Thrombozytenspendern im Rahmen der Apherese einen hohen Verlust von Lymphozyten feststellten. Man sah darin die Gefahr einer induzierten Immunschwäche (Winters 2006). Durch technische Verbesserung der Apheresegeräte konnte dieser Verlust minimiert werden (Lewis et al. 1997). Jedoch kam zunehmend die Vermutung auf, dass eine Langzeitthrombozytenspende zu einer Beeinträchtigung der Thrombopoese führen könnte (Stohlawetz et al. 1998). Unterstützende Studien bewegten die FDA 2005 zu einer Revision der Spenderegelung (Lazarus et al. 2001, U.S. Department of Health and Human Services 2005). Von nun an wurde die Apheresespende pro Spender auf 24 Produkte pro Jahr limitiert. Dies berücksichtigte die technische Entwicklung der vorangegangenen Jahre, wodurch doppel und dreifach Thrombozytenspenden sowie Multikomponentenspenden möglich wurden. Die negativen Auswirkungen dieser Neuregelung auf die US amerikanische Thrombozytenkonzentratproduktion hatten weitere Studien, mit Fokus auf die Thrombopoese bei chronischer Thrombozytenapherese, zur Folge. Mit Erfolg, denn nur 2 Jahre später entschärfte die FDA ihre Limitierung der Thrombozytenapherese wieder. Seitdem gilt die Empfehlung seitens der FDA für 24 Spendeprozeduren in 12 Monaten, unabhängig von der Anzahl gespendeter Produkte (U.S. Department of Health and Human Services 2007).

Ungeachtet aller nordamerikanischen Studienergebnisse hielt die deutsche Bundesärztekammer an ihren 1992 veröffentlichten Regularien zur Thrombozytenapherese fest. Diese beschränkt die Plättchenspende auf 26 Prozeduren pro 12 Monate (Bundesärztekammer. Wissenschaftlicher Beirat und Deutschland. Bundesgesundheitsamt 1992, Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut 2010). Die deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin & Immunhämatologie andererseits integrierte in ihre aktuelle Empfehlung zur Hämotherapie aus dem Jahr 2007 eine Volumenrestriktion für die Thrombozytenapherese (Matthes et al. 2007).

Dies zeigt, dass nach wie vor keine einheitliche Meinung zur Auswirkung der Thrombozytenapherese auf die Thrombopoese existiert.

6.1.1. Methodik

Bisherige Studien versuchten, die möglichen Auswirkungen der Thrombozytenapherese über die Blutplättchenkonzentration im peripheren Blut zu bestimmen.

Stohlawetz untersuchte das Vollblut von Plättchenspender auf retikulierte Thrombozyten. Dies sind unreife Thrombozyten, die kurz nach ihrer Abschnürung von den Megakaryozyten ins Blut freigesetzt werden und noch RNA Reste enthalten. Bei einem erhöhten Bedarf an Blutplättchen werden diese Zellen vermehrt ins periphere Blut freigesetzt. Die RNA Reste im Zytoplasma lassen sich histochemisch anfärben und ermöglichen eine mikroskopische Unterscheidung zu reifen Blutplättchen. Der Autor wählte für seine Studie zwei Gruppen von Thrombozytenspendern. Einerseits waren dies Spender die innerhalb der letzten 18 Monate jede zweite Woche eine Apherese hatten durchführen lassen. Als Kontrollgruppe wählte er Thrombozytenspender, die zu ihrer ersten Plättchenspende kamen. Das Blut der Spender wurde direkt vor und zu zwei Zeitpunkten nach der Spende untersucht (Stohlawetz et al. 1998).

In mehrere Arbeiten wurde ein retrospektiver Ansatz zur Evaluierung möglicher Langzeitfolgen genutzt. Lazarus und Richa analysierten die Veränderung der Thrombozytenkonzentration ihrer Spender. Lazarus verfolgte die Werte von 939 Spendern über einen Zeitraum von 4 Jahren zurück und setzte die Differenz zwischen erster und letzter Spende in Relation zur Spendefrequenz (Lazarus et al. 2001). Richa und Mitarbeiter verglichen über einen Beobachtungszeitraum von drei Jahren die Blutkonzentration der PLT, WBC, Lymphozyten und den Hb ihrer 453 Thrombozytenspender (Richa et al. 2008).

Auch die Gruppe um Katz untersuchte retrospektiv die Veränderung der Thrombozytenwerte. Ihr Kollektiv umfasste 953 Thrombozytenapheresespender eines Blutspendezentrums in den USA, deren Spendeaktivität sie über ein Jahr zurück verfolgten. Aus der Gesamtheit der Kohorte wählten die Autoren eine Untergruppe von 60 Langzeitspendern aus, welche im Untersuchungszeitraum die maximalen 24 Spenden geleistet hatten. Die Hälfte dieser Personen spendeten bereits seit über 10 Jahren Blutplättchen. Für diese Spenderuntergruppe

gingen die Autoren weiter in der individuellen Spenderkarriere zurück und bildeten aus den ersten aufgezeichneten Thrombozytenwerten einen durchschnittlichen Ausgangswert, welchen sie mit der aktuellen Plättchenkonzentration verglichen (Katz et al. 2007).

Keine der uns bekannten Studien untersuchte die Konzentration thrombopoetischer Zellen direkt.

Dass die Thrombozytenapherese eine Auswirkung auf die hämatopoetischen Stammzellen haben könnte, suggeriert die Arbeit von Weisbach. Die Gruppe untersuchte Thrombozytenspender auf Konzentrationsveränderungen ihrer hämatopoetischen Wachstumsfaktoren im Blut. Sie konnten feststellen, dass die Thrombopoietinwerte nach der Spende stark erhöht waren, während die SCF Werte sich im gleichen Maße verringerten. Die Autoren werteten dies als Zeichen eines Verbrauchs an SCF durch frühe hämatopoetische Vorläuferzellen, welche die Megakaryopoese fördern. Den kurzzeitigen Anstieg des Tpo interpretierten sie als Vorbote der darauffolgend vermehrten Thrombopoese. Weiterhin wiesen sie einen längerfristigen Anstieg der Epo Konzentration nach. Sie schlussfolgerten daraus, dass auch dieser Wachstumsfaktor einen Einfluss auf die Blutplättchenbildung haben muss (Weisbach et al. 1999).

In Zusammenschau dieser Vorarbeiten stellten wir uns die Frage, ob ein repetitiv erhöhtes Niveau an Wachstumsfaktoren bei Langzeitthrombozytenspendern eine Konzentrationsveränderung der thrombopoetischen Stammzellen bewirken kann. Unser Ziel war es die Stammzellkonzentration im Blut der Plättchendauerspender direkt zu messen. Mit diesem Ansatz versuchten wir die Lücke zwischen den Erkenntnissen aus retrospektiv erhobenen Zellzahlveränderungen unter der Thrombozytendauerspende und dem veränderten Wachstumsfaktorniveau zu betrachten.

Hämatopoetische Stammzellen finden sich nur in sehr geringer Konzentration im peripheren Blut. Eine Unterscheidung der einzelnen Subtypen ist mikroskopisch nicht möglich (Junqueira et al. 2004). Die einzelnen Zelltypen verfügen über eine individuelle Ausstattung mit Oberflächenantigenen. Bei der FACS Analyse ist eine Markierung dieser Antigene über fluoreszenzmarkierte spezifische Antikörper möglich. Dies gestattet eine Zuordnung der Zellen zu den verschiedenen Zelllinien (Rahman 2006).

Die Thrombozyten werden von Megakaryozyten gebildet, diese wiederum von unipotenten CFU-Meg (Deutsch und Tomer 2006). Thrombopoietin gilt als spezifischer Wachstumsfaktor

für Stammzellen der thrombozytären Linie (Kratz-Albers et al. 2000). Der Rezeptor für diesen Botenstoff ist der Tpo-R, welcher auch als CD110 bezeichnet wird (Mason et al. 2001). Neben CD110 besitzen die CFU-Meg das Antigen CD34 (AbD Serotec 2010). CD34 wiederum charakterisiert hämatopoetische Stammzellen. Mit zunehmender Enddifferenzierung der Vorläuferzellen verschwindet es von deren Zelloberfläche. Reife Zellen, wie zum Beispiel Megakaryozyten und Thrombozyten, präsentieren das CD34 nicht mehr (Krause et al. 1996).

Die Antigenkombination aus CD110 und CD34 machten wir uns bei der Analyse der thrombopoetischen Stammzellen zu Nutze. Über die Antikörper vermittelte Fluoreszenzmarkierung der Antigene bei der FACS Analyse, versuchten wir, die thrombozytären Stammzellen in unseren Blutproben isoliert zu betrachten.

Um unserer These nachzugehen, wurde ein Vergleich zwischen Blutspendern die sich erstmalig im Blutspendezentrum der Universitätsklinik Jena vorstellten und Langzeitthrombozytenspender, die innerhalb der letzten 24 Monate mindestens 10 Thrombozytenapheresen hatten durchführen lassen gezogen.

Während des Studienzeitraums stellten 183 Spender eine Blutprobe für diese Studie zur Verfügung. Nach Berücksichtigung der Einschlusskriterien und dem nachträglichen Ausschluss durch methodische Fehler konnten die Proben von 73 Langzeitthrombozytenspendern und 31 Erstspendern auf die Konzentration der thrombozytären Stammzellen untersucht werden.

Im Vergleich zu vorangegangenen Studien waren beide Vergleichsgruppen heterogen strukturiert. So zeigte sich zwischen den Gruppen eine ungleiche Geschlechter- und Altersverteilung. Während bei den Langzeitspendern 88% Männer waren und der Altersdurchschnitt 38 Jahre betrug, so war der Frauenanteil bei den Erstspendern mit 45% weitaus höher. Erwartungsgemäß war das Alter der Erstspender mit 28 Jahren niedriger als bei den Langzeitspendern.

Weitere Unterschiede bestanden in den Blutwerten zwischen den Spendergruppen. Langzeitspender hatten mit $5,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ durchschnittlich niedrigere Leukozytenwerte im Vergleich zur Gruppe der Erstspender mit $6,6 \times 10^3/\mu\text{l}$. Da die Leukozytenkonzentration einen grundlegenden Faktor in den Berechnungen dieser Arbeit darstellte, wurde dieser Unterschied in der statischen Auswertung berücksichtigt. Eine höhere Konzentration der Thrombozyten

und des Hämoglobins konnte in der Gruppe der Langzeitspender festgestellt werden. Ursächlich hierfür dürfte der höhere Männeranteil in dieser Population gewesen sein.

6.1.2. Ergebnisse

Die FACS Analyse der thrombozytären Stammzellen ergab einen Konzentrationsunterschied zwischen Erst- und Langzeit Spendern. Ohne die Hinzunahme der nicht CD45 markierten Proben war dieser Unterschied signifikant ($p=0,017$). Mit einem Mittelwert von 137 Zellen pro Mikroliter in der Gruppe der Thrombozytenspenden, hatten diese eine 20,8% höhere Konzentration an CD34, CD110 positiven Zellen im peripheren Blut, als die Gruppe der Erstspender, welche einen Durchschnittswert von 113/ μl aufwiesen.

Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass die Spenderbelastung durch eine rezidivierende Thrombozytenapherese einen Einfluss auf die Population der Thrombozyten bildenden Zellen hat. Es scheint, dass der immer wiederkehrende Stimulus eines akuten Thrombozytenverlustes zu einer Adaptation der Stammzellen führt. Kompensatorisch werden aus multipotenten Vorläuferzellen verstärkt unipotente CFU-Meg geprägt.

In bisherigen Veröffentlichungen die sich mit dem Langzeiteffekt einer chronischen Thrombozytenapherese auf die Thrombopoese befassten, wurde der Fokus auf die periphere Thrombozytenkonzentration gelegt.

Ende der 1990er Jahre schürten die Arbeiten von Stohlawetz und Lazarus die Befürchtung, dass eine chronische Thrombozytenapheresespende zu einer anhaltenden Thrombozytendepletion führen würde.

Stohlawetz und Kollegen stellten eine dauerhaft geringere Konzentration von retikulierten Thrombozyten bei Dauerspendern im Vergleich zu Erst Spendern fest. Dies sind junge, unreife Thrombozyten, die in einer akuten Bedarfssituation ins Blut freigesetzt werden. Die Autoren schlussfolgerten hieraus, dass die Thrombopoese bei Dauerspendern verlangsamt und eine Erschöpfung nicht auszuschließen ist (Stohlawetz et al. 1998).

Lazarus et al. stellten in ihrer retrospektiven Studie eine anhaltende Verminderung der Thrombozyten bei Langzeit Spendern fest. Dabei korrelierte die Senkung der Plättchenzahl, durchschnittlich um bis zu $50 \times 10^3/\mu\text{l}$, direkt mit der Anzahl an geleisteten Spenden. Diese

Reduktion führte bei 8,5% der Spender zu einem kurzfristigen Ausschluss von der Thrombozytenspende, weitere 0,5% mussten dauerhaft ausgeschlossen werden (Lazarus et al. 2001).

Die technische Weiterentwicklung der Apheresegeräte könnte eine Ursache dafür sein, dass nachfolgende Studien andere Resultate hervorbrachten.

Um die Messergebnisse dieser Arbeit besser in den Kontext aktueller Literatur setzen zu können, wurde eine Subgruppenanalyse der Plättchenspender durchgeführt. Hierfür wurden die initialen Blutwerte der Spender vor ihrer ersten Thrombozytenapherese mit den Werten bei Studieneintritt verglichen. Aus der Datenbank des Instituts für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Jena konnten die Ausgangswerte von 51 Langzeitthrombozytenspendern extrahiert werden.

Vor der ersten TK-Spende hatte diese Untergruppe von 51 LS durchschnittlich $249,3 \times 10^3/\mu\text{l}$ Thrombozyten im Blut. Über einen durchschnittlichen Zeitraum von 3,3 Jahren (0,7 - 10,1 Jahren) verminderte sich die mittlere Konzentration bis zum Studieneintritt auf $241,9 \times 10^3/\mu\text{l}$. Diese Verringerung um $7,3 \times 10^3/\mu\text{l}$ war signifikant ($p=0,000$) und vergleichbar mit den Ergebnissen von Quraishy et. al. In ihrer Studie von 91 Thrombozytenspendern mit mindestens 20 Apheresen pro Jahr, wiesen sie einen klinisch irrelevanten jährlichen Verlust von $3,9 \times 10^3/\mu\text{l}$ Thrombozyten nach. Risikofaktoren für die Plättchenreduktion konnte sie nicht feststellen (Quraishy et al. 2006)

In anderen Arbeiten konnte eine solche Thrombozytenverminderung nicht nachvollzogen werden.

Sanchez und Kollegen sahen keine Tendenz zu einer Thrombozytenverminderung bei ihren 437 Thrombozytenspendern mit mehr als 24 Apheresen pro Jahr. Jedoch beschränkte sich der Beobachtungszeitraum auf 12 Monate. Wenige Individuen hatten höhere Plättchenwerte als zu Beginn. Einen Einfluss der Spendenanzahl oder des Gesamtvolumens konnten sie nicht aufzeigen (Sanchez et al. 2006).

Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Katz et. al. Auch bei dieser Arbeit wurden LS mit mindestens 24 Spenden im Jahr untersucht. Die Autoren eruierten hierbei den individuellen Ausgangswert zu Beginn der Spenderkarriere und verglichen diesen mit der aktuellen PLT Konzentration. Dies war ihnen, aufgrund fehlender Daten, jedoch nur für 30 Spender möglich.

Da sie außerdem eine Verfälschung der Blutwerte durch veränderte Messtechniken nicht ausschließen konnten, werteten sie die geringfügige Erhöhung der Thrombozytenkonzentration nicht (Katz et al. 2007).

Geringe Steigerungen der Thrombozytenzahlen wurden in den Arbeiten von Richa und Vassallo nachgewiesen.

Vassallo und Kollegen werteten die Blutwerte von 909 Thrombozytenspendern aus dem Zeitraum 1997 bis 2005 aus. Über eine durchschnittliche Spenderkarriere von 5,9 Jahren zeigte sich eine Steigerung der Thrombozytenwerte von $0,264 \times 10^3/\mu\text{l}$ pro Jahr. Individuen mit einer Steigerung von über $0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ pro Jahr spendeten mit stärker schwankenden PLT Werten über einen geringeren Zeitraum. Bei den Hochfrequenzspendern, wiesen über 60-jährige ein höheres Risiko für eine anhaltende PLT Senkung auf. Bei unter 45-jährigen kam es hingegen zu einer Steigerung der Thrombozytenzahl (Vassallo et al. 2006).

In unserer Studie konnte ein Einfluss des Spenderalters auf die Veränderung Thrombozytenkonzentration nicht nachgewiesen werden ($p=0,645$).

Richa und Mitarbeiter wiesen sogar eine deutlichere Steigerung der Thrombozytenkonzentration, als Vassallo et al., bei LS nach. Die 471 Spender, welche sie über 3 Jahre beobachteten, spendeten bis zu 34 Mal. Sie verzeichneten eine signifikante, wenn auch klinisch unbedeutende, Steigerung der Thrombozyten um $14 \times 10^3/\mu\text{l}$ (-103 bis $+207 \times 10^3/\mu\text{l}$) (Richa et al. 2008).

Bei genauer Betrachtung der Veränderung der Thrombozytenwerte in unserer Arbeit unterliegen diese einer starken interindividuellen Streuung. So schwankt die Differenz zwischen dem Initialwert und dem bei Studieneintritt gemessenen zwischen $-99 \times 10^3/\mu\text{l}$ und $+65 \times 10^3/\mu\text{l}$.

Trotz des teilweisen hohen Thrombozytenverlustes fiel die Zellzahl bei keinem der 51 Probanden unter den Grenzwert von $150 \times 10^3/\mu\text{l}$. Dies wird auch durch Richa et al. bestätigt, welche keinen Spender aufgrund zu niedriger Plättchenwerte ($<150 \times 10^3/\mu\text{l}$) von der Thrombozytenspende ausschließen mussten (Richa et al. 2008).

In der vorliegenden Studie war ein Zusammenhang zwischen der Veränderung der Zellzahl und dem initialen Thrombozytenwert nachweisbar ($p=0,031$). Besonders Spender mit einem hohen Ausgangswert an Thrombozyten wiesen einen stärkeren Verlust dieser Zellen auf. Die

Spendenhäufigkeit ($p=0,895$) und das gespendete Gesamtvolumen ($p=0,999$) korrelierten nicht mit der Thrombozytendifferenz. Im Gegensatz hierzu steht die Arbeit von Richa, in welcher eine Steigerung der Thrombozytenkonzentration bei LS in Abhängigkeit zum gespendeten Thrombozytenvolumen jedoch nicht zur Spendenanzahl beschrieben wird (Richa et al. 2008).

Lazarus und Kollegen beschrieben 2001 einen drastischen Thrombozytenverlust von durchschnittlich 10-20% in ihrem Studienkollektiv von Thrombozytenspendern. 8,5% ihrer Spendern fielen mit ihren Thrombozyten unter den Referenzwert von $150 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Lazarus et al. 2001). Die von uns erhobene Plättchenverminderung von 2,9% fällt weit weniger dramatisch aus und entspricht am ehesten den Ergebnissen von Quraishy (Quraishy et al. 2006).

Wir widersprechen damit den Daten von Vassallo, Katz und Richa, die eine geringfügige Steigerung der Thrombozytenzahl bei ihren LS feststellen konnten. Die Aussagekraft unserer 51 Probanden starken Kohorte ist, im Vergleich zu den viel größeren Studienpopulationen von Vassallo und Richa mit 909 respektive 471 Spendern, jedoch limitiert (Vassallo et al. 2006, Katz et al. 2007, Richa et al. 2008).

Die Ergebnisse aus unserer longitudinalen Betrachtung der Langzeitthrombozytenspender scheinen im Widerspruch zu den Erkenntnissen über die thrombozytären Stammzellen zu stehen.

Einerseits konnten wir eine 20,8%ige Erhöhung der Stammzellen verzeichnen. Andererseits sank die Plättchenzahl im Mittel um 2,9%. Letzteres ist durch einen hohen Plättchenverbrauch mit einem eventuell unterliegenden latenten Eisenmangel erklärbar, welcher bereits indirekt in der Arbeit von Stohlawetz nachgewiesen wurde (Stohlawetz et al. 1998). Die Erhöhung der peripheren Stammzellkonzentration deuten wir als eine verstärkte Mobilisierung dieser Zellen unter dem Dauerreiz der Thrombozytenapherese. Die Ursache dafür könnten repetitiv erhöhte Konzentrationspiegel an Wachstumsfaktoren sein.

Weiterhin ist anzumerken, dass die Thrombozytenkonzentration in der Gruppe der Langzeitspender bereits vor Beginn ihrer Spenderkarriere im Schnitt ca. 12% höher waren ($249 \times 10^3/\mu\text{l}$), als in der Gruppe von Erstspendern ($223 \times 10^3/\mu\text{l}$). Es ist denkbar, dass Thrombozytenspender als speziell selektionierte Spenderpopulation bereits zu diesem

Zeitpunkt eine größere Stammzellpopulation im peripheren Blut aufwiesen. Eine Beurteilung ist uns mangels diesbezüglicher Verlaufsdaten jedoch nicht möglich.

Ob die in dieser Arbeit gemessene erhöhte periphere Stammzellkonzentration mit einer Vergrößerung des Stammzellpools im Knochenmark einhergeht bleibt offen.

6.1.3. Limitation und Schlussfolgerung

Eine Einordnung der gewonnenen Ergebnisse in den Kontext vorangegangener Veröffentlichungen fällt schwer. Nach aktuellem Kenntnisstand existiert keine weitere Studie, die einen ähnlichen Ansatz zur Beurteilung der Thrombopoeseleistung der Spender, über die periphere Konzentration der thrombozytären Stammzellen, verfolgt. Erschwerend kommt die verhältnismäßig kleine Studienkohorte dieser Arbeit hinzu.

Kritisch ist anzusehen, dass unter Hinzunahme der nicht CD45 markierten Proben sich der Unterschied zwischen beiden Gruppen minimalisierte. Eine statistische Signifikanz war nicht mehr feststellbar ($p=0,500$). Dies beruhte besonders auf einer starken Konzentrationsverminderung seitens der LS um 21 Zellen/ μl auf 116 pro Mikroliter. Der Durchschnittswert in der Gruppe der ES blieb mit 110/ μl nahezu unverändert. Erklärbar ist dies durch die sehr ungleichmäßige Verteilung der nicht CD45 markierten Proben. Von insgesamt 39 Blutproben entfiel lediglich eine auf die ES, die restlichen 38 waren LS. Die grundsätzliche Frage, warum bei den nicht CD45 markierten Proben generell eine geringer Zellkonzentration gemessen wurde bleibt ungeklärt. Der statischen Auswertung mittels Bland-Altman-Plot zur Folge sollten die Analysemasken unabhängig vom CD45 Status ähnliche Werte messen.

Unter kritischer Betrachtung der Herangehensweise stellt sich außerdem die Frage, ob das Ziel einer selektiven Betrachtung der thrombozytären Stammzellen erreicht werden konnte. Die in dieser Arbeit gewählte Antikörpermarkierung beschränkte sich auf Zellen, welche die Oberflächenantigene CD34, CD110 und CD45 aufwiesen.

Nach neueren Erkenntnissen ist anzunehmen, dass die Antigenkombination CD34 und CD110 sich nicht ausschließlich auf thrombozytären Stammzellen finden lässt.

Weit nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit erschien Anfang 2012 ein Review von Yu und Cantor. Hierin zeichnen die Autoren ein komplexeres Bild. So sind CD110 und CD34 auf weniger differenzierten Zellen wie der bipotenten megakaryotisch-erythrozytären Progenitorzellen und sogar multipotenten CFU-GEMM Vorläufern zu finden. (Yu und Cantor 2012).

Alexander und Kollegen zeigten in ihrer Untersuchungen an Tpo Knockout Mäusen, dass neben der Beeinträchtigung der Thrombopoese eine Reduktion der myeloischen und erythrozytären Progenitorzellen nachgewiesen werden kann (Alexander et al. 1996). Unterstützt wird diese Erkenntnis durch die Daten von Ballmaier et al., die bei Patienten mit kongenitaler amegakaryotischer Thrombozytopenie (CAMT) eine Mutation im CD110 nachwiesen (Ballmaier et al. 2001). Neben einer massiven juvenilen Thrombozytopenie entwickeln CAMT Patienten median im zweiten Lebensjahr eine Panzytopenie (Ballmaier et al. 2003). Dies verdeutlicht, dass Thrombopoietin und sein Rezeptor eine weitaus größere Funktion, als nur die Stimulation der Thrombo- und Megakaryopoese haben.

Dennoch bleibt die 20,8% höhere Konzentration an CD34, CD110 positiven Zellen. Auch wenn eine strikte Zuordnung zur thrombozytären Linie zu eindimensional erscheint, so repräsentieren diese Zellen trotzdem Stammzellen. Denn der CD34 Oberflächenmarker ist auf reifen Zellen nicht zu finden (Krause et al. 1996). Eine Erklärung hierfür könnte der Regulationsmechanismus der Tpo Konzentration sein. Maßgeblich wird dieser durch die Endozytoseaktivität der Thrombozyten geprägt. So geht eine geringe Anzahl an Blutplättchen mit einem erhöhten Tpo Angebot einher (Kaushansky 2005). Thrombopoietin wirkt durch die Präsenz des CD110 auch auf undifferenzierte Stammzellen. Als Wachstumsfaktor regt es zur Zellproliferation an (de Graaf und Metcalf 2011). Der rezidivierende Thrombozytenverlust führt folglich zu einer wiederkehrend erhöhten Tpo Konzentration. Die Vermehrung hämatopoetischer Stammzellen wäre hierüber gut erklärbar.

6.2. Endotheliale Stammzellen

Neben den thrombozytären Stammzellen wurden die Blutproben der Probanden auf endotheliale Stammzellen untersucht.

Karadogan und Kollegen wiesen im Blut von Thrombozytenspendern nach der Apherese eine 7,5-fache Erhöhung der TNF-alpha Konzentration nach (Karadogan et al. 2000). TNF-alpha wiederum, als proinflammatorisches Zytokin, führt zu einer endothelialen Dysfunktion (Bhagat und Vallance 1997). Diese geht mit einer lokalen Entzündungsreaktion einher und beeinträchtigt die Vasomotorik (Chia et al. 2003). Ridker et al. stellten bei Patienten mit wiederholt auftretenden koronaren Komplikationen nach Herzinfarkt eine erhöhte TNF-alpha Konzentrationen fest (Ridker et al. 2000). Wir leiteten daraus ab, dass die Apherese-prozedur mit einem Endothelschaden vergesellschaftet ist und stellten die Hypothese auf, dass dies zu einer verstärkten Mobilisation endothelialer Progenitorzellen führen könnte.

Es wird angenommen, dass endotheliale Stammzellen und hämatopoetische Zellen dieselben Vorläufer haben (Ciraci et al. 2011). Die erhöhte Konzentration an Wachstumsfaktoren nach einer Apherese könnten somit auch die Population der endothelialen Stammzellen beeinflussen (Dettke et al. 1998). Battinelli und Mitarbeiter wiesen den endothelialen Wachstumsfaktor VEGF in der alpha Granula der Thrombozyten nach. Bekannterweise wirkt dieser auf die EPC und fördert die Reparatur von Endothelschäden sowie die Neoangiogenese (Battinelli et al. 2011). Der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen Thrombozyten und EPC gelang der Gruppe um Lev (Lev et al. 2006).

6.2.1. Methodik

Für die Analyse endothelialer Stammzellen in den Blutproben der LS wurde erneut die Fluoreszenzmarkierung spezifischer Oberflächenantigene eingesetzt. Hierbei kam die von Peichev und Kollegen propagierte Antigenkombination aus CD34, CD133 und VEGF-R2, um zirkulierende Endotheliale Progenitorzellen zu selektieren, zur Anwendung (Peichev et al. 2000). Eine Abgrenzung der gesuchten Zellpopulationen war hierdurch sehr gut realisierbar.

Zum Planungszeitpunkt dieser Studie war dies die allgemein anerkannte Antigenkombination, welche auch von vielen anderen Autoren zur Untersuchung von CEPC verwendet wurde.

Timmermans revidierte diese Annahme 2009 in seinem Review. Er bezeichnet diese Zellen als endothel-like Zellen, welche zwar eine stimulierende Wirkung auf Endothelzellen und deren Progenitoren haben, jedoch selber kein Endothel bilden können (Timmermans et al. 2009). Da sich auch aktuellere Studien immer noch auf die von uns gewählte Antigenkombination beziehen, ist davon auszugehen, dass nach wie vor kein abschließender Konsens gefunden worden ist (Leshem-Lev et al. 2010).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist uns keine vergleichbare Studie bekannt, welche die endothelialen Stammzellen im Kontext der Apheresespende betrachtet.

6.2.2. Ergebnisse

In der Vergleichsmessung von endothelialen Progenitorzellen bei Langzeitthrombozytenspendern zu Erstspendern konnte eine erhöhte Konzentration dieser Zellen bei den Langzeitspendern gemessen werden.

Unter Ausschluss der nicht CD45 markierten Proben konnten die Blutproben von 42 LS und 32 ES analysiert werden. Die Gruppe von Dauerspendern wies mit 28,24 Zellen/ μ l eine mehr als 2,5-mal höhere Konzentration von EPC im peripheren Blut auf als die Kontrollgruppe von Erstspendern (10,47/ μ l). Unter Beachtung des divergenten mittleren Spenderalters und mittleren WBC zwischen beiden Gruppen war dieser Unterschied statistisch signifikant ($p=0,003$). Die Hinzunahme der nicht CD45 markierten Proben erhöhte die Anzahl an Langzeitspender auf 82, während die der Erstspender mit 33 fast unverändert blieb. Im Gegensatz zu den Resultaten der Analyse der thrombozytären Stammzellen änderte die Integration der nicht CD45 markierten Proben das Ergebnis unwesentlich. Die 82 LS wiesen im Mittel 26,01 Zellen pro μ l auf, während bei den 33 ES nur 11,25/ μ l gemessen werden konnten. Der Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,001$).

Eine lineare Korrelation der erhöhten Zellzahl mit der Anzahl an durchgeführten Blutspenden unabhängig vom Blutprodukt oder Thrombozytenapheresespenden im Speziellen konnte nicht nachgewiesen werden. Auch ein Zusammenhang mit dem kumulativ gespendeten Volumen an Thrombozytenkonzentraten und damit der Häufigkeit von Einfach- bzw. Doppelspenden war statistisch nicht gegeben.

Unseren Ergebnissen folgend, ist die Konzentration von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen im Blut von Thrombozytenapheresespendern erhöht. Diese Konzentrationssteigerung scheint unabhängig von der Anzahl der geleisteten Spenden zu sein. Wir leiten daraus ab, dass Apherese assoziierte Endothelreizung zu einer anhaltend erhöhten Mobilisierung von EPC im peripheren Blut von Apheresespendern führt.

Ob eine erhöhte EPC Konzentration klinische Langzeitfolgen für die Spender hat ist unklar. Angesichts der Studienerkenntnisse der letzten Jahre wäre ein protektiver Effekt bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen denkbar.

6.2.3. Schlussfolgerung

Verschiedene Studien konnten einen Zusammenhang zwischen einer verminderten EPC Konzentration und einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen feststellen.

So wiesen Fadini et al. bei gesunden Probanden mit einer verdickten Arteria carotis interna niedrigere EPC Konzentrationen als in der Vergleichsgruppe mit normal starker Gefäßwand nach. Dieser Zusammenhang bestand auch für den 10 Jahres Framingham Score. Beide Variablen gelten als Surrogatmarker für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko. Ihr Ergebnis bezog sich jedoch lediglich auf die Antigenkombination CD34 und VEGF-R2. Die Dreifachkombination mit CD133 verfehlte eine statistisch signifikante Korrelation (Fadini et al. 2006).

Andererseits stimmen ihre Erkenntnisse mit denen von Hill et al. überein, die einen Zusammenhang zwischen einer verminderten EPC Konzentration und einer verschlechterten Endothelfunktion nachwiesen. Die Autoren schlussfolgerten, dass die anhaltende Gefäßendothelschädigung zu einem erhöhten Verbrauch von EPC führt und in der Folge sich die Gefahr einer kardiovaskulären Erkrankung erhöht (Hill et al. 2003).

Dass die verminderte EPC Konzentration auch klinische Auswirkungen hat, erwies die Arbeit von Werner und Mitarbeiter. So hatten Patienten mit koronarer Herzerkrankung ein höheres Risiko einen kardial bedingten Tod zu erleiden, wenn sie eine geringere EPC Konzentration im Blut aufwiesen (Werner et al. 2005).

Einen klinisch relevanten Zusammenhang zwischen einer verminderten EPC Konzentration und einem erhöhten Risiko an einer erektilen Dysfunktion zu erkranken konnten Baumhäkel et al. nachweisen (Baumhäkel et al. 2006).

Dass eine höhere EPC Konzentration einen Benefit für Patienten mit Arteriosklerose bedingten Erkrankungen hat, lässt sich aus der Arbeit von Flores-Ramirez schlussfolgern. Die Forschergruppe injizierte Herzinsuffizienzpatienten EPC in die Koronararterien und konnten im Verlauf eine Verbesserung der Herzleistung feststellen (Flores-Ramirez et al. 2010).

Da es sich bei unserer Studienpopulation um Blutspender handelt ist davon auszugehen, dass dieser Personenkreis gesund ist. Besonders das mittlere Alter von 29 Jahren unserer Erstspender lässt darauf schließen, dass diese nicht an einer schweren Arteriosklerose erkrankt waren. Dennoch war ihre EPC Konzentration im Mittel 63% niedriger als bei der 37 Jahre alten Vergleichsgruppe von Langzeitthrombozytenspendern. Angesichts des bekannten Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen bei einer verminderten EPC Konzentration schlussfolgern wir, dass die Thrombozytenapheresespende, durch die Mobilisierung von EPC, möglicherweise einen Benefit für die Spender bezüglich ihres kardiovaskulären Erkrankungsrisikos birgt. Zur Bestätigung dieser Annahme sind Langezeitstudien notwendig.

6.3. Weitere Blutbildveränderungen

In den Anfängen der Thrombozytenapherese erregten besonders die hohen Verluste an Lymphozyten Besorgnis (Strauss 1984). Technische Verbesserungen reduzierten diese Nebenwirkung deutlich. Dennoch konnten auch aktuelle Studien einen geringen, aber signifikanten Verlust an weißen Blutzellen direkt nach der Apherese nachweisen (Tendulkar und Rajadhyaksha 2009, Das et al. 2009).

Diese Senkung der Leukozytenkonzentration ist auch langfristig bei TK-Dauerspendern nachweisbar. Richa et al. wiesen eine Veränderung der WBC um $-0,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($-7,9$ bis $3,5 \times 10^3/\mu\text{l}$) und Lymphozyten um $-0,06 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($-2,27$ bis $1,76 \times 10^3/\mu\text{l}$) nach. Beide korrelierten mit PLT Spendenanzahl und Volumen, hatten aber keine klinischen Auswirkungen (Richa et al. 2008).

Auch bei den TK-Dauerspendern der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Verminderung der Leukozyten festgestellt werden. Durchschnittlich sank die WBC

Konzentration um $0,58 \times 10^3/\mu\text{l}$, bei einem mittleren Ausgangswert von $6,12 \times 10^3/\mu\text{l}$. Dies entspricht einem Verlust von 13,1% unter der Thrombozytendauerspender (p=0,000). Bei zwei der 51 Langzeitthrombozytenspender lag der Leukozytenwert, mit $3,1 \times 10^3/\mu\text{l}$ respektive $3,5 \times 10^3/\mu\text{l}$, unter dem Grenzwert von $4,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Hagemann 2010).

Ähnlich wie bei den Thrombozyten korrelierte auch für die Leukozyten der initiale Blutwert mit der Konzentrationsveränderung unter der Apherese (p=0,008). Höhere Ausgangswerte gingen mit einem stärkeren Verlust einher.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einfluss der Thrombozytenapherese auf die Leukozytenkonzentration gering ist, in Ausnahmefällen jedoch klinisch relevant werden kann.

Richa und Kollegen untersuchten neben den zuvor genannten Blutbildveränderungen die Hämoglobinkonzentration ihrer TK-Spender. Sie konnten keine Veränderungen feststellen (Richa et al. 2008).

Im Gegensatz dazu stehen unsere Ergebnisse die eine signifikante Reduktion des Hb um 0,15 g/dl zeigen (p=0,000). Die individuelle Veränderung variierte mit -1,7 bis +2,1 g/dl stark. Drei männliche Spender wiesen mit 13,9 bzw. 13,7 g/dl Konzentrationen unterhalb des Grenzwertes von 14,0 g/dl auf (Hagemann 2010). Die gemessene Verminderung korrelierte mit der Anzahl an Thrombozytenspenden und dem gespendeten TK-Gesamtvolumen. Die Gruppe um Stohlawetz konnte in ihrer Arbeit keine Erniedrigung des Hb feststellen, jedoch wies sie signifikant geringe Ferritinwerte bei Langzeitthrombozytenspendern nach. Die Autoren schlossen hieraus, dass der chronische Blutverlust bei der Thrombozytenapherese zu einem latenten Eisenmangel führen kann (Stohlawetz et al. 1998). Unter dieser Annahme wäre auch die von uns gemessene geringgradige Hb Reduktion erklärbar.

7. Schlussfolgerungen

Die Thrombozytenapheresespende ist nach dem aktuellen Wissen für die Spender harmlos.

In unserer Studie kam es unter einer Dauerspender zu keiner klinisch relevanten, dauerhaften Verminderung der Thrombozytenkonzentration. Der Lymphozytenverlust war zwar signifikant, aber auch hieraus ergaben sich keine Komplikationen für die Patienten.

Unter dem Reiz einer repetitiven Thrombozytenapherese kommt es zu einer verstärkten Liberation von hämatopoetischen und endothelialen Stammzellen in das periphere Blut der Spender. Die klinischen Folgen sind ungewiss.

Die Thrombozytendauerspender führt langfristig zu einer klinisch irrelevanten Konzentrationsverminderung der Thrombozyten. Die Konzentration thrombozytärer beziehungsweise hämatopoetischer Stammzellen im peripheren Blut ist bei diesen Spendern jedoch erhöht. Ursächlich hierfür könnte eine sequentiell erhöhte Konzentration von Wachstumsfaktoren im Blut der Dauerspender sein. Ob dies mit einer Vergrößerung des Pools knochenmarksstämmiger hämatopoetischer Zellen einhergeht, kann anhand unserer Arbeit nicht beurteilt werden.

Der Reiz der sequentiellen Apherese-prozedur führt außerdem zu einer gesteigerten Konzentration endothelialer Stammzellen im peripheren Blut der Spender. Mehrere klinische Studien zeigten eine Assoziation zwischen einer Verminderung dieser Zellen und einem erhöhten Risiko für vaskuläre Erkrankungen. Folglich könnte sich aus der Thrombozytenapherese ein protektiver Effekt für die Spender ergeben. Diese Vermutung ließe sich jedoch nur durch Langzeitdaten nachweisen.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

AbD Serotec. 2009. Datasheet LNK023RPE Oxford.

AbD Serotec. 2010. Human CD Antigen Expression.

Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D. 1996. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood*, 87 (6):2162-2170.

Alitalo K, Carmeliet P. 2002. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*, 1 (3):219-227.

Amrein K, Katschnig C, Sipurzynski S, Stojakovic T, Lanzer G, Stach E, Pieber TR, Dobnig H. 2010. Apheresis affects bone and mineral metabolism. *Bone*, 46 (3):789-795.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275 (5302):964-967.

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 18 (14):3964-3972.

Ballmaier M, Germeshausen M, Krukemeier S, Welte K. 2003. Thrombopoietin is essential for the maintenance of normal hematopoiesis in humans: development of aplastic anemia in patients with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Ann N Y Acad Sci*, 996:17-25.

Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A, Krukemeier S, Eilers M, Strauss G, Welte K. 2001. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood*, 97 (1):139-146.

Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE, Jr. 2011. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood*, 118 (5):1359-1369.

Baumhäkel M, Werner N, Böhm M, Nickenig G. 2006. Circulating endothelial progenitor cells correlate with erectile function in patients with coronary heart disease. *Eur Heart J*, 27 (18):2184-2188.

BD Biosciences. 2010. Technical Data Sheet BD FACS Lysing Solution San Jose.

BD Biosciences. 2011. Technical Data Sheet APC Mouse Anti-Human CD34 San Jose.

Bhagat K, Vallance P. 1997. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation*, 96 (9):3042-3047.

Bonnet D. 2003. Hematopoietic stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69 (3):219-229.

Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. 1991. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*, 3 (2):175-184.

Bundesärztekammer, Paul-Ehrlich-Institut. 2010. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) : mit 14 Tabellen. Gesamtnovelle 2005, mit Richtlinienanpassung 2010. Aufl. Köln: Dt. Ärzte-Verl.

Bundesärztekammer. Wissenschaftlicher Beirat, Deutschland. Bundesgesundheitsamt. 1992. Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion. Überarb. Fassung 1991. Aufl. Köln: Dt. Ärzte-Verl.

Bundesregierung Deutschland. 2009. Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens.

Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. 2003. Intra-arterial tumor necrosis factor- α impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (4):695-701.

Chou FS, Mulloy JC. 2011. The thrombopoietin/MPL pathway in hematopoiesis and leukemogenesis. *J Cell Biochem*, 112 (6):1491-1498.

Ciraci E, Della Bella S, Salvucci O, Rofani C, Segarra M, Bason C, Molinari A, Maric D, Tosato G, Berardi AC. 2011. Adult human circulating CD34^{Lin}CD45^{CD133} cells can differentiate into hematopoietic and endothelial cells. *Blood*, 118 (8):2105-2115.

Civin CI, Strauss LC, Fackler MJ, Trischmann TM, Wiley JM, Loken MR. 1990. Positive stem cell selection--basic science. *Progress in clinical and biological research*, 333:387-401; discussion 402.

Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, Simmons PJ, Peault B, Buck DW, Huttner WB. 2000. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*, 275 (8):5512-5520.

Das SS, Chaudhary R, Verma SK, Ojha S, Khetan D. 2009. Pre- and post- donation haematological values in healthy donors undergoing plateletpheresis with five different systems. *Blood Transfus*, 7 (3):188-192.

de Graaf CA, Metcalf D. 2011. Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle*, 10 (10):1582-1589.

de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 255 (5047):989-991.

Dettke M, Hlousek M, Kurz M, Leitner G, Roskopf K, Stiegler G, Stohlawetz P, Worel N, Hocker P, Panzer S. 1998. Increase in endogenous thrombopoietin in healthy donors after automated plateletpheresis. *Transfusion*, 38 (5):449-453.

Deutsch VR, Tomer A. 2006. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*, 134 (5):453-466.

Dome B, Timar J, Ladanyi A, Paku S, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Lang G, Dome P, Bogos K, Tovari J. 2009. Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: From biology to therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 69 (2):108-124.

Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. 1998. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*, 282 (5390):946-949.

- Fadini GP, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A, de Kreutzenberg SV. 2006. Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke*, 37 (9):2277-2282.
- Fargeas CA, Corbeil D, Huttner WB. 2003. AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature. *Stem Cells*, 21 (4):506-508.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. 1990. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, 75 (12):2417-2426.
- Florek M, Haase M, Marzesco AM, Freund D, Ehninger G, Huttner WB, Corbeil D. 2005. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res*, 319 (1):15-26.
- Flores-Ramirez R, Uribe-Longoria A, Rangel-Fuentes MM, Gutierrez-Fajardo P, Salazar-Riojas R, Cervantes-Garcia D, Trevino-Ortiz JH, Benavides-Chereti GJ, Espinosa-Oliveros LP, Limon-Rodriguez RH, Monreal-Puente R, Gonzalez-Trevino JL, Rojas-Martinez A. 2010. Intracoronary infusion of CD133+ endothelial progenitor cells improves heart function and quality of life in patients with chronic post-infarct heart insufficiency. *Cardiovasc Revasc Med*, 11 (2):72-78.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376 (6535):66-70.
- Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. 2000. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, 95 (10):3106-3112.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 273 (46):30336-30343.

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. 2001. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*, 88 (2):167-174.

Grouven U, Bender R, Ziegler A, Lange S. 2007. [Comparing methods of measurement]. *Dtsch Med Wochenschr*, 132 Suppl 1:e69-73.

Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. 1994. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science*, 265 (5177):1445-1447.

Hagemann O Laborlexikon <http://www.laborlexikon.de>.

Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*, 21:107-137.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 348 (7):593-600.

Hristov M, Erl W, Weber PC. 2003. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (7):1185-1189.

ImmunoTools. Data Sheet anti-human CD45 FITC-conjugated Friesoythe.

Institut für Transfusionsmedizin Universität Jena. 2008. Laborbuch.

Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M. 2004. Histologie. 6., überarb. und aktualisierte Aufl. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Karadogan I, Ozdogan M, Undar L. 2000. Single automated donor plateletpheresis increases the plasma level of proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha which does not associate with endothelial release markers von Willebrand factor and fibronectin. *Transfus Sci*, 23 (3):171-175.

Karkkainen MJ, Petrova TV. 2000. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*, 19 (49):5598-5605.

Katz L, Palmer K, McDonnell E, Kabat A. 2007. Frequent plateletpheresis does not clinically significantly decrease platelet counts in donors. *Transfusion*, 47 (9):1601-1606.

- Kaushansky K. 2005. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*, 115 (12):3339-3347.
- Kaushansky K. 2009. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:147-152.
- Khan SS, Solomon MA, McCoy JP, Jr. 2005. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 64 (1):1-8.
- Kiefel V. 2010. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Grundlagen - Therapie - Methodik* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. 2004. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24 (8):1442-1447.
- Kratz-Albers K, Scheduling S, Mohle R, Buhring HJ, Baum CM, Mc Kearn JP, Buchner T, Kanz L, Brugger W. 2000. Effective ex vivo generation of megakaryocytic cells from mobilized peripheral blood CD34(+) cells with stem cell factor and promegapoeitin. *Exp Hematol*, 28 (3):335-346.
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. 1996. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87 (1):1-13.
- Lazarus EF, Browning J, Norman J, Oblitas J, Leitman SF. 2001. Sustained decreases in platelet count associated with multiple, regular plateletpheresis donations. *Transfusion*, 41 (6):756-761.
- Leshem-Lev D, Omelchenko A, Perl L, Kornowski R, Battler A, Lev EI. 2010. Exposure to platelets promotes functional properties of endothelial progenitor cells. *J Thromb Thrombolysis*, 30 (4):398-403.
- Lev EI, Estrov Z, Aboulfatova K, Harris D, Granada JF, Alviar C, Kleiman NS, Dong JF. 2006. Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost*, 96 (4):498-504.
- Lewis SL, Kutvirt SG, Bonner PN, Simon TL. 1997. Effect of long-term platelet donation on lymphocyte subsets and plasma protein concentrations. *Transfus Sci*, 18 (2):205-213.

Mason DY, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, De Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Hořejší V, Meuer S, Morissey J, Schwartz-Albiez R, Shaw S, Simmons D, Uguccioni M, Van Der Schoot E, Viver E, Zola H. 2001. CD antigens 2001. *Tissue Antigens*, 58 (6):425-430.

Matthes G, Moog R, Radtke H, Wiesneth M, Zingsem J. 2007. Durchführung präparativer Hämapheresen zur Gewinnung von Blutbestandteilkonzentraten – Empfehlungen zur präparativen Hämapherese der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI)*. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 34 (5):367-374.

Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C. 1999. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*, 18 (2):363-374.

Miltenyi Biotec. 2007a. Datasheet FcR Blocking Reagent Bergisch Gladbach.

Miltenyi Biotec. 2007b. Datasheet CD133/2 (293C3) antibodies Bergisch Gladbach.

Mizrak D, Brittan M, Alison MR. 2008. CD133: molecule of the moment. *J Pathol*, 214 (1):3-9.

Nielsen JS, McNagny KM. 2009. CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation*, 16 (6):487-496.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95 (3):952-958.

Pschyrembel W, Dornblüth O. 2007. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 261., neu bearb. und erw. Aufl. Aufl. Berlin [u.a.]: de Gruyter.

Qualitätsmanagement Universitätsklinikum Jena. 2010. Jahresbericht 2009.

- Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. 2001. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol*, 115 (1):186-194.
- Quraishy N, Notari E, Burch J, Eder A, Heal J, Janas J, Miller Y, Moroff G, Siegfried B, Strupp A, Vassallo R, Wise E, Benjamin R. 2006. Impact of Frequent Plateletpheresis on Donor Platelet Counts. *Transfusion*, 46S:5A.
- R&D Systems Inc. 2008. Datasheet Monoclonal Anti-human VEGF R2-PerCP.
- R&D Systems Inc. 2009. Datasheet Monoclonal Anti-human Thrombopoietin R Antibody.
- Rahman M. 2006. Introduction to Flow Cytometry AbD Serotec.
- Richa E, Krueger P, Burgstaler EA, Bryant SC, Winters JL. 2008. The effect of double- and triple-apheresis platelet product donation on apheresis donor platelet and white blood cell counts. *Transfusion*, 48 (7):1325-1332.
- Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. 2004. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci*, 117 (Pt 16):3539-3545.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. 2000. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*, 101 (18):2149-2153.
- Sanchez R, Malone M, Hirschler N, Nguyen K. 2006. Does Frequent Plateletpheresis Donation Deplete Donor Platelets? A Longitudinal Evaluation. *Transfusion*, 46S:5A-6A.
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, Schmidt Lang H. 2010. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 31., überarb. und aktualisierte Aufl. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin.
- Shibuya M. 2006. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*, 39 (5):469-478.
- Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. 2005. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (4):715-719.

- Stohlawetz P, Stiegler G, Jilma B, Dettke M, Hocker P, Panzer S. 1998. Measurement of the levels of reticulated platelets after plateletpheresis to monitor activity of thrombopoiesis. *Transfusion*, 38 (5):454-458.
- Strauss RG. 1984. Apheresis donor safety--changes in humoral and cellular immunity. *J Clin Apher*, 2 (1):68-80.
- Sysmex. 2006. SI-Einheiten - kleiner Leitfaden Norderstedt: www.sysmex.de.
- Tendulkar A, Rajadhyaksha SB. 2009. Comparison of plateletpheresis on three continuous flow cell separators. *Asian J Transfus Sci*, 3 (2):73-77.
- Tiedt R, Coers J, Ziegler S, Wiestner A, Hao-Shen H, Bornmann C, Schenkel J, Karakhanova S, de Sauvage FJ, Jackson CW, Skoda RC. 2009. Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. *Blood*, 113 (8):1768-1777.
- Timmermans F, Plum J, Yoder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. 2009. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*, 13 (1):87-102.
- Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G, Tonlorenzi R, Porretti L, Gavina M, Mamchaoui K, Pellegrino MA, Furling D, Mouly V, Butler-Browne GS, Bottinelli R, Cossu G, Bresolin N. 2004. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest*, 114 (2):182-195.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2005. Collection of Platelets by Automated Methods Rockville:
- U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Collection of Platelets by Automated Methods Rockville:
- Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (26):14720-14725.
- Vassallo R, Murphy S, Notari E. 2006. Changes in Donor Platelet Counts with Repeated Plateletpheresis Procedures *Transfusion*, 46S:5A.

- Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. 1992. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (12):5640-5644.
- Weisbach V, Friedlein H, Glaser A, Zingsem J, Zimmermann R, Eckstein R. 1999. The influence of automated plateletpheresis on systemic levels of hematopoietic growth factors. *Transfusion*, 39 (8):889-894.
- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. 2005. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 353 (10):999-1007.
- Whitaker BI, Henry RH, Schlumpf K, Schulman J, Green J. 2011. Report of the US Department of Health and Human Services. The 2009 national blood collection and utilization survey report. Washington, DC: US Department of Health and Human Services.
- Winters JL. 2006. Complications of donor apheresis. *J Clin Apher*, 21 (2):132-141.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 90 (12):5002-5012.
- Yu M, Cantor AB. 2012. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis: an update on cytokines and lineage surface markers. *Methods Mol Biol*, 788:291-303.
- Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Clark G, Drbal K, Engel P, Hart D, Horejsi V, Isacke C, Macardle P, Malavasi F, Mason D, Olive D, Saalmueller A, Schlossman SF, Schwartz-Albiez R, Simmons P, Tedder TF, Uguccioni M, Warren H. 2005. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood*, 106 (9):3123-3126.

9. Anhang

9.1. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Marco Julius Schnabel

Geboren am: 05.03.1985 in Bernburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

Ab 01/2012	Assistenzarzt für Urologie, Caritas-Krankenhaus St. Josef, Lehrstuhl der Universität Regensburg
05/2011	2.Staatsexamen Humanmedizin (Note „gut“)
08/2006	1.Staatsexamen Humanmedizin (Note „gut“)
2004 - 2011	Humanmedizinstudium Friedrich-Schiller-Universität Jena
2003 - 2004	Zivildienst Kreiskrankenhaus Altenburg
1995 - 2003	Abitur Platanengymnasium Altenburg (Note „gut“)

Praktische Erfahrung:

Praktisches Jahr:

10/2010-01/2011	Urologie, Universitätsklinikum Jena
06-09/2010	Innere Medizin, Universitätsspital Basel, Schweiz
03-04/2010	Chirurgie, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Kanada
01-02/2010	Chirurgie, McMaster University, Hamilton, Ontario, Kanada

Famulaturen:

08/2009	Allgemeinmedizin, Praxis Dipl. med. Schnabel, Ziegelheim
08/2008	Gastroenterologie, Southeast Missouri State Hospital, Cape Girardeau, Missouri, USA
03/2008	Neurochirurgie, Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik, Murnau am Staffelsee
10/2007	Allgemeinchirurgie, Kreiskrankenhaus, Altenburg
08/2007	Anästhesie, Ameos Diakonie-Klinikum, Ueckermünde

Regensburg, 11.08.2012

9.2. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dagmar Barz für die Möglichkeit an ihrem Institut zu promovieren.

Des Weiteren möchte ich Dr. Volker Oberle für seine tatkräftige Unterstützung beim Versuchsaufbau und Durchführung des Zytometeranalysen danken.

Weiterhin geht mein Dank an Dr. Thomas Lorenzen für die Zuarbeit der Spenderdaten, sowie den Mitarbeitern im Institut für Transfusionsmedizin für die praktische Hilfe bei meinen Messreihen.

Auch sei an dieser Stelle mein Dank an Dr. Mario Walther gerichtet, mit dessen Hilfe die statistische Auswertung dieser Dissertation entstanden ist.

Ein herzliches Dankeschön geht an Annegret Eckart, welche sich die Mühe machte diese Arbeit Korrektur zu lesen.

9.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Volker Oberle, Dr. Mario Walther,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Regensburg, 11.08.2012
